

BEST AVAILABLE COPY

Appl. No. 10/311,621  
Conf. No. 9306

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2000年 6月20日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2000-184502

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
号

the country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2000-184502

願 人  
Applicant(s):

住友製薬株式会社  
株式会社高研

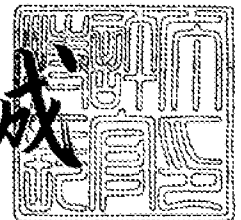
BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2006年 5月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中 嶋 誠



出証番号 出証特2006-3036994

【書類名】 特許願

【整理番号】 171195

【提出日】 平成12年 6月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 48/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院医学系研究科内

    【氏名】 久保田 俊一郎

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都中央区築地5-5-1 国立がんセンター内

    【氏名】 寺田 雅昭

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都中央区築地5-5-1 国立がんセンター研究所内

    【氏名】 落谷 孝広

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都目黒区中根2-11-21 株式会社高研研究所内

    【氏名】 伊藤 博

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都目黒区中根2-11-21 株式会社高研研究所内

    【氏名】 古瀬 正康

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社製剤技術研究所内

    【氏名】 佐野 明彦

## 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社  
社製剤技術研究所内

【氏名】 永原 俊治

## 【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】 591071104

【住所又は居所】 東京都新宿区下落合3丁目5-18

【氏名又は名称】 株式会社高研

## 【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809450

【包括委任状番号】 9809905

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 オリゴヌクレオチド導入製剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コラーゲンを必須成分とする標的細胞への所望のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 2】 標的細胞が動物細胞である請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 3】 標的細胞が治療を必要とする臓器あるいは組織またはその付近の細胞である請求項 2 記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 4】 コラーゲンがアテロコラーゲンである請求項 1～3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 5】 コラーゲンの分子量が約 30 万～約 90 万である請求項 1～5 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 6】 持続性製剤である請求項 1～5 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 7】 オリゴヌクレオチドが 5 量体以上 30 量体以下の請求項 1～6 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 8】 オリゴヌクレオチドが DNA あるいは DNA 誘導体である請求項 6 または 7 記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 9】 オリゴヌクレオチドが RNA あるいは RNA 誘導体である請求項 7 または 8 記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【請求項 10】 DNA 誘導体あるいは RNA 誘導体が分子内に少なくとも 1 つ以上のホスホロチオエート結合を有する請求項 8 または 9 記載のオリゴヌクレオチド導入製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアンチセンス治療に使用される、コラーゲンを必須成分とする標的細胞へのオリゴヌクレオチド導入製剤に関する。さらに詳細には、本発明はコラー

ゲンを必須成分とすることにより、標的細胞に効率よくオリゴヌクレオチドを導入できる安全な製剤に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

近年の遺伝子情報解析技術の急速な進歩によって、疾病の原因となる遺伝子情報が蓄積されてきている。例えば、感染症の分野に於いては、細菌やウイルスが増殖あるいは生存するのに必須な遺伝子情報が明らかになっている。また、種々の疾患において、原因となる遺伝子情報、あるいはその遺伝子情報の過剰な発現や変異などが明らかとなり、その遺伝子情報と症状を発現するメカニズムの関係が明らかになってきている。

#### 【0003】

アンチセンス療法は上記のような疾患に関与する遺伝子情報の発現を制御または抑制してその疾患の治療や予防を行う方法である。

具体的には例えば、

(1) 発現を制御または抑制したい遺伝子のm-RNAまたはm-RNA前駆体と相補的な塩基配列を有する10量体～30量体程度のオリゴヌクレオチドを投与し、

(2) 細胞内で該オリゴヌクレオチドがm-RNAまたはm-RNA前駆体と二重鎖を形成し、

(3) リボゾームによるm-RNAの翻訳の阻害、RNase Hによる二重鎖の切断、あるいはm-RNA前駆体のスプライシングを阻害し、これにより遺伝子の発現を抑制する。

また、これ以外に直接標的の遺伝子の二重鎖DNAに結合して三重鎖を形成し、m-RNAへの転写を阻害する方法もある。

#### 【0004】

アンチセンス療法は1970年代の後半にTs'oとMillerら(Biochemistry, 16, 1988-1996, 1977)及びZamecnikら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280-284, 1978)によって提唱されて以来、盛んに研究が行われてきた。当初、アンチセンス療法の研究は天然型のDNAあるいはRNAのオリゴヌクレオチドを用いて行われたが、例えば、

(1) 天然型のオリゴヌクレオチドは生体内のヌクレアーゼにより短時間に分解され失活すること、

(2) また、負に荷電したオリゴヌクレオチドが同じく負に荷電した細胞膜を通過して細胞内に入ることは困難であること等

の問題がある。このことから、DNAあるいはRNAの構造を基本として様々に修飾を施したオリゴヌクレオチドが開発され、用いられている。これらの修飾を施したオリゴヌクレオチドのうち最も実用的であるのは、各ヌクレオシド間のジエステル結合をホスホロチオエート結合に置換したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド(以下、S-オリゴヌクレオチドと略す。)であり、現在までに実施されたほとんどの臨床試験ではS-オリゴヌクレオチドが使用されている。

#### 【0005】

しかしながらS-オリゴヌクレオチドであっても、例えば

(1) 天然型オリゴヌクレオチドほど早くはないが、生体内のヌクレアーゼによって分解され失活する、

(2) 天然型オリゴヌクレオチドに比べてm-RNAへの二重鎖形成能力が低い、

(3) 二重鎖形成能力が低いために高濃度で標的細胞に投与する必要がある、

(4) 高濃度で全身的に投与した場合、サイトカインの放出や血液凝固の阻止や補体の活性化、アレルギー反応などを生じる、

(5) 生体内のタンパク質と特異的あるいは非特異的に結合するため、標的m-RNAと二重鎖を形成できないばかりでなく非特異的な作用を生じる、等の問題があり、アンチセンス療法の要求を十分に満たせているわけではなく、実用化には至っていない。これらの問題点は第一世代とされるS-オリゴヌクレオチドに限らず、現在までに開発されているいわゆる第二及び第三世代のアンチセンス療法用オリゴヌクレオチド(横山和尚、化学と生物、36、556-559、1998)に当てはまる。これらの問題点のため、オリゴヌクレオチドを用いた標的遺伝子の発現抑制はin vitroでは良い効果が得られても、in vivo特に臨床試験では良い効果が得られないというのが一般的な認識となっており、実際、アンチセンス医薬品の臨床実験が良い効果が得られないため中止される例は多い。

#### 【0006】

村上 はこれらの臨床試験が打ち切られた理由がアンチセンス医薬品のデリバリーにあるとし、アンチセンス医薬品開発の成否はデリバリー方法の開発が左右すると述べている(村上 章、生体の科学, 49, 309-314, 1998)。オリゴヌクレオチドをデリバリーする方法は、これまで主としてオリゴヌクレオチドの細胞内への透過性と移行を改善することを目的として種々の検討が行われてきた。これらを解決するために横山の総説(横山和尚、細胞工学, 16, 1463-1473, 1997)では、

- (1) ポリ-L-リジンやポリエチレンジイミンなどの多荷電化合物とオリゴヌクレオチドを共役させる、
- (2) 複製欠損アデノウイルスのカプシドの存在下でトランスフェリン/ポリ-L-リジン-共役DNAを使用する、
- (3) インフルエンザウイルスHA表面タンパク質由来のfusogenicペプチド (Bongartz, J.P.ら、Nucleic Acids Research, 22, 4681-4688, 1994) やショウジョウバエのAntennapediaタンパク質のホメオドメインの断片を使用する、
- (4) 葉酸あるいはアシアロ糖タンパク質受容体、またはトランスフェリンとオリゴヌクレオチドを結合させ、特異的な細胞表面の受容体にターゲティングする、
- (5) コレステロールと結合する、
- (6) カチオン性脂質へ封入する、

等の方法が挙げられている。これらの検討はオリゴヌクレオチドの細胞内への透過性と移行を改善することを主眼とはしているものの、細胞に直接オリゴヌクレオチドを投与できるin vitroの実験では良い効果が得られても、in vivoでは期待された十分な効果は得られておらず、実用化には問題があった。

#### 【0007】

例えば、カチオン性脂質(リボソーム)にオリゴヌクレオチドを封入して投与する方法は、in vitroではオリゴヌクレオチドを細胞内に効率よく導入するため最も盛んに研究されているが、in vivoでは投与後直ちに全身に拡散するため高濃度で標的細胞に作用できないこと、体内のタンパク質がリボソームに結合して標的細胞への接着を阻害すること、リボソームを構成しているカチオン性脂質に細胞毒性があることなどから実用的なレベルでの成果は得られていない。実際、



S-オリゴヌクレオチドを用いた臨床試験でリボソームが使用されたことはなく(生体の科学, 49, 309-314, 1998)、臨床に実用的なオリゴヌクレオチドのデリバリー方法の開発が望まれている。

#### 【0008】

一方、プラスミドDNAまたはウイルスベクターを生体親和性材料あるいは骨親和性材料から徐々に溶出させて、遺伝子導入を行う方法が特開平9-71542、USP5763416に開示されている。これらにはコラーゲン等の生体親和性材料あるいは骨親和性材料が分子量265万～530万のプラスミドDNA(4000bp～8000bpに相当)あるいはそれ以上の分子サイズを有するウイルスベクターを生体内で徐放して良好な発現効率を示すことが記載されている。しかし、これらプラスミドDNAまたはウイルスベクターの導入が要求される標的細胞一つあたりに、導入されるプラスミドDNAまたはウイルスベクターの個数は、アンチセンス療法で要求されるオリゴヌクレオチドの導入個数に比べて極めて小さい。これはプラスミドDNAあるいはウイルスベクターにコードされた遺伝情報は標的細胞に導入された後、多数のm-RNAに転写されて発現するため、標的細胞一つあたり一個のプラスミドDNAあるいはウイルスベクターが導入されれば、遺伝子の発現が見られるためこれで充分であるからである。一方、アンチセンス療法においては、オリゴヌクレオチドが細胞内に導入され、標的のm-RNAと強固な二重鎖を形成し遺伝子発現を抑制するためには、細胞内のオリゴヌクレオチド濃度を極力高める必要がある。上記特開平9-71542およびUSP5763416には、コラーゲン等の生体親和性材料あるいは骨親和性材料が、プラスミドDNAあるいはウイルスベクターに比して極めて小さいオリゴヌクレオチド(一本鎖であって、分子量が約3,300～約9,900程度)を徐放し、かつ遺伝子発現を抑制することができるか否か、更に標的細胞内において、臨床上、十分に、有効な濃度にオリゴヌクレオチド濃度を高めることができるか否かについては、具体的にはなにも示唆されていない。

#### 【0009】

更に上記先行技術には、アンチセンス療法に用いることのできる下記のような特徴を持つオリゴヌクレオチド導入製剤はなにも示唆されていない。

1) 生体に投与したオリゴヌクレオチドがヌクレアーゼによる分解から保護され

ること。

2) 生体に投与したオリゴヌクレオチドを生体内のタンパク質との特異的あるいは非特異的な結合から保護すること。

3) 標的m-RNAと強固な二重鎖を形成して発現を抑制できるように細胞内のオリゴヌクレオチドの濃度を高めるために、標的細胞周囲でのオリゴヌクレオチドの濃度を高濃度に維持すること。

4) 全身性の副作用を生じないように標的細胞周囲のみでオリゴヌクレオチドの濃度を高濃度に維持すること。

5) 一回の投与あたりの、m-RNAの発現を抑制できる期間を長期化することが求められること。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、アンチセンス療法等に必要なおリゴヌクレオチドを細胞に効率よく導入できる剤を提供し、種々の疾患を治療することにある。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、標的m-RNAと相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとコラーゲン（更に医療上許容される添加剤）からなる製剤が、*in vivo*で副作用を誘発することなく標的m-RNAの発現を効果的に抑制し、かつ長期にその効果が維持されることを見出し、さらに検討を重ね本発明を完成するに至った。

#### 【0012】

すなわち本発明は：

(1) コラーゲンを必須成分とする標的細胞への所望のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(2) 標的細胞が動物細胞である(1)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(3) 標的細胞が対象疾患の治療を必要とする臓器あるいは組織またはその付近の細胞である(2)のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(4) コラーゲンがアテロコラーゲンである(1)～(3)のいずれかに記載の

オリゴヌクレオチド導入製剤；

(5) コラーゲンの分子量が約30万～約90万である(1)～(4)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(6) オリゴヌクレオチド導入製剤が持続性製剤である(1)～(5)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(7) オリゴヌクレオチドが5量体以上30量体以下の(1)～(6)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(8) オリゴヌクレオチドがDNAあるいはDNA誘導体である(6)または(7)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(9) オリゴヌクレオチドがRNAあるいはRNA誘導体である(7)または(8)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(10) DNA誘導体あるいはRNA誘導体が分子内に少なくとも1つ以上のホスホロチオエート結合を有する(8)または(9)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(11) オリゴヌクレオチドが少なくともその一部が生体の恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコードした遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖と生理的な条件下で相補的に結合する塩基配列を有する(1)～(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(12) オリゴヌクレオチドが少なくともその一部が病原性のウイルスあるいは細菌に特異的な遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖と生理的な条件下で相補的に結合する塩基配列を有する(1)～(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(13) オリゴヌクレオチドがメッセンジャーRNAの開始コドンを含む領域あるいは前駆メッセンジャーRNAがスプライシングを受ける部位に相補な配列を有する(1)～(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(14) 恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコードした遺伝子のがん遺伝子である(11)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；

(15) がん遺伝子、増殖因子群、受容体型チロシンキナーゼ群、非受容体型チロシンキナーゼ群、GTP結合タンパク質、セリン・スレオニンキナーゼ群、転

- 写調節因子群の中から選ばれる(14)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (16) がん遺伝子がhst-1あるいはオルニチン脱炭酸酵素をコードする遺伝子である(14)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (17) オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドの細胞への導入を促進する物質または核への移行を促進する物質中に包含されているか、あるいは該物質と複合体を形成している(1)～(11)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (18) 細胞への導入を促進する物質がカチオン性リポソーム、膜融合型リポソームあるいはカチオン性のポリマーである(17)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (19) コラーゲンが真皮由来の1型コラーゲンあるいは遺伝子工学的に生産される1型コラーゲンである(1)に記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (20) 医学上許容される添加剤を更に含む(1)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (21) 添加剤が単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖またはそれぞれの糖アルコール、非疎水性アミノ酸類、カルボキシル基を2個以上有する有機酸類である(1)のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (22) 溶液状、懸濁液状、スポンジ状、ペレット状または粉末状の形状を有する(1)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (23) pH4～8の溶液状または懸濁液状の(22)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (24) コラーゲンの含量が0.001%～10%(w/w)の範囲である溶液状または懸濁液状の(22)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- (25) コラーゲンの含量が5～99%(w/w)の範囲であるスポンジ状、ペレット状または粉末状である(22)記載のオリゴヌクレオチド導入製剤；
- 等に関する。

### 【0013】

また本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤を生体に投与することからなるがんのアンチセンス療法に、詳細には、所望のオリゴヌクレオチドとコラ

ーゲンを含むオリゴヌクレオチド導入製剤を生体に例えば、経皮、皮下、皮内、筋肉、腹腔内、脳内、組織、血管内、口腔内、直腸内、消化管等に投与し、細胞に効率よく該オリゴヌクレオチドを導入することからなるアンチセンス療法に関する。

#### 【0014】

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤、更に具体的には、オリゴヌクレオチド溶液をコラーゲン溶液（更に医療上許容される添加剤）と混合して得られた溶液あるいは懸濁液製剤は、

- 1) フィルム状、スポンジ状、粉末状、ミニベレット状等に目的に応じて成形が可能であり、
- 2) 該製剤を標的組織中あるいは近傍に投与後、製剤が投与部位に滞留し、
- 3) オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼによる分解から保護され、
- 4) 製剤からオリゴヌクレオチドが徐放され、
- 5) 製剤からのオリゴヌクレオチドの放出速度を目的に応じて制御することが可能で
- 6) 標的組織近傍でオリゴヌクレオチド濃度を高濃度で維持し、
- 7) *in vivo*で副作用を誘発することなく標的m-RNAの発現を効果的に抑制し、かつ長期にその効果が維持されることを特徴とする。

更に本発明は、上記製剤を用いた感染症の治療及び予防方法、あるいは特定の遺伝情報の過剰な発現によって誘起される諸疾患の治療及び予防方法、特に癌の治療及び予防方法に関する。

#### 【0015】

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤は、オリゴヌクレオチド溶液とコラーゲン溶液を混合した溶液あるいは懸濁液そのものであるか、あるいはこれらの溶液あるいは懸濁液をフィルム状、スポンジ状、粉末状、ミニベレット状に成形したものであることから、本発明で使用するコラーゲンは、酸性あるいは中性の水に可溶であり、孔サイズが1マイクロメートルのメンブレンフィルターを通過できることが望ましい。コラーゲンの可溶性はコラーゲンの架橋度に依存し、架橋度が高いほど不溶化することから、本発明に使用するコラーゲンの架橋度は、例え

ば、3量体以下であることが望ましく、より好ましくは2量体以下が望ましい。コラーゲンの分子量は、例えば、約30万から90万が好ましく、約30万から約60万がより好ましい。具体的には、例えば、哺乳動物の真皮から酸抽出したI型コラーゲンが挙げられ、より望ましくは、例えば、仔牛の真皮から酸抽出したI型コラーゲン、遺伝子工学的に生産されるI型コラーゲンなどが挙げられる。同じI型コラーゲンでも腱由来のコラーゲンは架橋度が高く不溶性であるため適さない。また、安全性の面から抗原性の高いテロペプチドを酵素的に除去したアテロコラーゲンあるいは遺伝子工学的に生産されるアテロコラーゲンが望ましく、1分子あたりチロシン残基が3以下であるアテロコラーゲンがより好ましい。

#### 【0016】

本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは具体的には、例えば、5量体以上30量体以下のオリゴヌクレオチドであり、より具体的には例えば、15量体以上25量体以下のオリゴヌクレオチドである。

また、本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは具体的には、例えば、DNA、DNA誘導体、RNA、RNA誘導体等が挙げられ、より具体的には、例えば、DNA誘導体、RNA誘導体等の分子内に少なくとも1つ以上のホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

#### 【0017】

本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは、さらに具体的には、例えば、少なくともその一部が生体の恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコードした遺伝子、病原性のウイルス、細菌等に特異的な遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と生理的な条件下で相補的に結合する塩基配列等を有し、より具体的には、病原性ウイルス、細菌等に特異的な遺伝子及び恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質等をコードした遺伝子のメッセンジャーRNAと相補的に結合する塩基配列を有する。

#### 【0018】

更に具体的には、本発明に用いられるオリゴヌクレオチドは、例えば、メッセンジャーRNAの開始コドンを含む領域あるいは前駆メッセンジャーRNAがスプライ

シングを受ける部位に相補的な配列等を有する。本発明に用いられるオリゴヌクレオチドの例を示せば、がんの治療あるいは予防に用いるオリゴヌクレオチドとしては、例えば、hst-1の発現を特異的に抑制する5'-CTCGTAGGCGTTGTACTTGT-3'の配列を有したオリゴヌクレオチド、あるいはプロテインキナーゼC $\alpha$ の発現を特異的に抑制して非小細胞性肺がんや結腸がんなどの進行性がんの有効で、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、膵臓がん、大腸がん、小細胞肺がんへの適用が試みられているISIS3521、C-rafキナーゼの発現を特異的に抑制して前立腺がん、乳がん、卵巣がん、脳腫瘍、膵臓がん、大腸がん、小細胞肺がんへの適用が試みられているISIS5132/CGP69846A、Ha-rasの発現を特異的に阻害して大腸がん、乳がん、脳腫瘍、膵臓がん、肺小細胞がんへの適用が試みられているISIS2503、プロテインキナーゼAタイプIの発現を特異的に抑制するGEM231、DNAメチルトランスフェラーゼの発現を特異的に抑制するMG98、c-mycの発現を抑制するINXC-6295、c-mybの発現を抑制し白血病への適用が検討されているINX-3001、bcl-2の発現を抑制して非ホジキンリンパ腫、大腸がん、小細胞肺がん、白血病、乳がん、リンパ腫、前立腺がんへの適用が検討されているG3139、MDM2蛋白の発現を抑制するオリゴヌクレオチド、VEGFの発現を抑制するオリゴヌクレオチドなどを挙げる事ができる。また、感染症の治療あるいは予防に用いるオリゴヌクレオチドとしては、HIVの増殖を抑制するGEM92、GPI-2A、サイトメガロウイルスの増殖を抑制するISIS2922(fomivirsen)、Vitravene、ISIS13312、GEM132、C型肝炎ウイルスの増殖を抑制するISIS14803などが挙げられ、炎症の治療に用いられるオリゴヌクレオチドとしては、ICAM-1の発現を特異的に抑制しクローン病、潰瘍性大腸炎、腎移植拒絶反応阻害、乾癬、喘息への適用が試みられているISIS2302、TNF- $\alpha$ 、CD49d (VLA-4)、VCAM-1、PECAM-1の発現を抑制するオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。また、経皮経管冠動脈形成術後の再狭窄を防止するオリゴヌクレオチドとして、c-mycの発現を抑制するResten-NGなどが挙げられる。

#### 【0019】

恒常性を乱す生理的な効果を有するタンパク質をコードする遺伝子は具体的には、例えば、がん遺伝子とよばれる一群の遺伝子群が挙げられる。より具体的には、例えば、増殖因子群、受容体型チロシンキナーゼ群、非受容体型チロシンキ

ナーゼ群、GTP結合タンパク質、セリン・スレオニンキナーゼ群、転写調節因子群などが挙げられる。更に具体的には、例えば、hst-1あるいはオルニチン脱炭酸酵素等をコードする遺伝子等が挙げられる。

### 【0020】

本発明のオリゴヌクレオチドは、一般にオリゴヌクレオチドの細胞への導入を促進する物質または核への移行を促進する物質中に包含させるかあるいは該物質と複合体を形成させてもよい。前者の例として、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、疎水性ポリマー等を挙げることができる。「カチオン性脂質」として、DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N-トリメチルアンモニウムクロライド)、DOSPA (2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート)、DDAB (ジメチルジオクタクレシルアンモニウムブロミド)、TM-TPS (N,N I, N I I, N I I I-テトラメチル-N,N', N', N', N'-テトラバルミチルスベルミン)、DMRIE (1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド)、N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニウムアセチル)-ジドデシル-D-グルタメートクロライド(Biochemical Biophysical Research Communication, 196, 1042(1994))等が挙げられ、これらのカチオン性脂質とDOPE (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン)等の中性脂質からなるカチオン性リポソーム、あるいはカチオン性脂質とコレステロールとの混合物も用いることができる。「カチオン性ポリマー」はオリゴヌクレオチドと静電的な相互作用をするポリマーであり、例えばDOGS (ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン)等のリポポリアミン、AlkCWK<sub>18</sub>等のペプチド、ポリリジンやその誘導体(Proceedings of Academy Sciences of the USA, 89, 6094 (1992))等のカチオン性ポリアミノ酸およびその誘導体、ポリエチレンジアミン、ポリアミン dendrimer等が挙げられる。「疎水性ポリマー」は遺伝子と疎水的な相互作用をするポリマーであり、例えばポリビニルアルコールやポリビニルピロリドン等が挙げられる。その他、AlkCWK<sub>18</sub>等のペプチドも用いることができる。

上記カチオン性リポソームとしては、例えば、DOSPAとDOPEを1:1で含むLIP



OFECTAMINE (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)、DO TMAとDOPEを1:1で含むリボソーム、DDABとDOPEを1:2.5で含むLIPOFECTACE (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)、TM-TPSとDOPEを1:1.5で含むCELLFECTIN (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)等を挙げることができるが、これらに限定されない。また、上記カチオン性脂質とコレステロールの混合物とは、例えばDMRIEとコレステロールのモル比で1:1の混合物であるDMRIE-C (Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)を挙げることができる。

オリゴヌクレオチドは膜融合型リボソーム中に包含されていてもよくあるいはリボソームと複合体を形成してもよい。膜融合型リボソームとしては例えばHVJ-リボソーム等が挙げられる。

遺伝子の核への移行を促進する物質としては、HMG-1および2の混合物 (high mobility group-1,2 mixture: 実験医学, 12, 184 (1994))等を挙げることができる。

#### 【0021】

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤中のコラーゲンとオリゴヌクレオチドの量比は、コラーゲンによる、1)ヌクレアーゼあるいは他のタンパク質からのオリゴヌクレオチドの保護、2)オリゴヌクレオチドの徐放、3)オリゴヌクレオチドの局所滞留及びそれによる局所での高濃度維持、4)オリゴヌクレオチドの細胞内への導入促進、を達成する上で重要である。コラーゲンとオリゴヌクレオチドの量比は、オリゴヌクレオチドの鎖長が目的に応じて如何ようにも選択できることから、コラーゲン1分子に対するオリゴヌクレオチドの負電荷の数により表すことが出来る。本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤において望ましいコラーゲン1分子に対するオリゴヌクレオチドの負電荷の数は10~5000であり、望ましくは20~2500、より望ましくは50~1000である。

#### 【0022】

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤は、オリゴヌクレオチドとコラーゲンに加えて医学上許容される添加剤を更に含むことができる。

具体的には、これらの添加剤は溶液状あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド

導入製剤のpHを調整する目的で用いられる塩類およびアミン類、あるいは高粘度の溶液状、懸濁液状あるいはスポンジ状、フィルム状、円柱状及び粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤からオリゴヌクレオチドの放出を制御する効果を有する添加剤である。塩類、アミン類としては、例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、クエン酸ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、無水リン酸一ナトリウム、無水リン酸二水素ナトリウムなどが挙げられる。

放出を制御する効果を有する添加剤としては、具体的には、例えば、単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖もしくはこれらの糖アルコールまたはこれらの誘導体、アミノ酸類、カルボキシル基を2個以上有する有機酸類、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、アルギン酸、アガロース、アラビアゴムなどである。

単糖としては、例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース等が挙げられ、好ましくはグルコースである。二糖としては、例えば、シュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロースなどが挙げられる。

糖アルコールとしては、例えば、ソルビトール、マンニトール等が挙げられ、好ましくはマンニトールである。

糖誘導体には、例えば、デオキシ糖、アミノ糖、リン酸エステル類およびこれらを構成成分とする二糖などがある。

### 【0023】

アミノ酸類としては、医学的に許容されるアミノ酸およびその塩、ならびにこれらの誘導体などが挙げられる。アミノ酸類としては、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸などの酸性アミノ酸、リジン、アルギニン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸、グリシン、アラニン、メチオニン、プロリン、シスチン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、イソロイシン、システイン、チロシン、トリプトファン、ロイシンなどが挙げられる。本発明におけるアミノ酸類とは、他に塩基性あるいは中性の側鎖が存在しているアミノ酸も包含される。アミノ酸の塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられる。

カルボキシル基を2個以上有する有機酸およびその塩としては、好ましくは、例えばカルボキシル基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩が挙げられ、よ

り好ましくは飽和または不飽和脂肪族の該有機酸などが挙げられる。カルボキシル基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩として、例えばクエン酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸およびその塩などが挙げられ、好ましくは例えば、クエン酸、酒石酸塩およびその塩などが挙げられる。あるいは、オリゴヌクレオチドの細胞内におけるエンドソームでの分解を抑えるために、例えばエンドソームの内容物を放出する能力を有する不活化したアデノウイルス、CHEMS（コレステロールヘミスクシネートモルホリン塩）等を用いることもできる。

#### 【0024】

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤には、上記の糖類、アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類のいずれかを含有する製剤およびこれらのうち任意の2者または3者を含有する製剤が含まれる。

添加剤を用いて放出を制御する場合には、その添加剤の含有量で調節することができる。例えば放出時間を長くするには添加剤の含有量を下げ、短くするには添加剤の含有量を高くする。添加剤の量は、具体的にはコラーゲンに対し、0～約19800w/w%の範囲から選択できる。好ましい範囲としては約1～約1890w/w%の範囲が挙げられる。より好ましくは約20～約900w/w%の範囲が挙げられる。更に好ましくは約80～300w/w%の範囲が挙げられる。

#### 【0025】

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤は、溶液状あるいは懸濁液状であるか、あるいは溶液状あるいは懸濁液状の形態を経てスポンジ状、円柱状あるいは粉末状に加工されたものである。溶液状あるいは懸濁液状の本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤のpHは4～8の範囲であり、コラーゲンを0.001%～10%(w/w)含有し、好ましくは0.1%～5%(w/w)含有する。スポンジ状、ペレット状あるいは粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤は5～99%(w/w)、好ましくは10～70%(w/w)、より好ましくは25～50%のコラーゲンを含有する。

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤は、例えば、経皮、皮下、皮内、筋肉、脳内、組織、血管内投与することができる。投与回数は3日から約2ヶ月に1回、好ましくは、1週間から1ヶ月に一回である。

## 【0026】

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤の投与量は、溶液状あるいは懸濁液状の製剤の場合にはその液量で、スポンジ状製剤の場合には製剤の大きさで、円柱状製剤の場合は径と長さで、さらに粉末状製剤の場合は粉体体積あるいは重量で容易に調節することができる。また、製剤中のオリゴヌクレオチド含有量によっても投与量を調節できる。

本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤の最適な投与量は、適応疾患、投与部位、投与方法、剤形の種類、患者の性別、年齢、症状などによって異なるが、製剤中のオリゴヌクレオチド量としては、治療対象に対して例えば、0.001mg/kg～40mg/kg、好ましくは0.01mg/kg～30mg/kgである。

## 【0027】

溶液状あるいは懸濁液状の本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

- 1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、均一な溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、均一な溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、均一な溶液状オリゴヌクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴヌクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴヌクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 6) 所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添

加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴヌクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

7) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、均一な溶液状オリゴヌクレオチド導入製剤あるいは懸濁液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；などが挙げられる。この時、溶液状の製剤を得るか、懸濁液状の製剤を得るかはオリゴヌクレオチド溶液およびコラーゲン溶液の各々の濃度によって調節する。

### 【0028】

フィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば

1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

6) 所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

7) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液

を徐々に乾燥させてフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；などが挙げられる。

#### 【0029】

スポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

- 1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要なに応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 2) 必要なに応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 3) コラーゲン溶液に、必要なに応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 4) 必要なに応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要なに応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；などが挙げられる。

#### 【0030】

粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

- 1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要なに応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 2) 必要なに応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

- 3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 6) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 7) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 8) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 9) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 10) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；
- 11) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそ

のまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

12) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

13) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

14) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

15) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

16) 所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；

17) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して粉末状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る方法；などが挙げられる。

### 【0031】

円柱状のオリゴヌクレオチド導入製剤の製造方法としては、例えば、

1) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；



2) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

3) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

4) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

5) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

6) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

7) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

8) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

9) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

10) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

11) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

12) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

13) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた懸濁液をろ過して得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

14) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

15) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

16) 所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

17) 必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を乾燥し、得られた乾燥品をコラーゲン溶液に溶解させ、得られた懸濁液をろ過し、得られた沈殿物をそのまま、あるいは粉碎して得られた粉末を円柱状に圧縮成形する方法；

18) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

19) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオ

チド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥してして得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

20) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

21) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

22) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジを円柱状に圧縮成形する方法；

23) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

24) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

25) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

26) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させ、得られた均一な溶液あるいは懸濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

27) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に溶解させて、得られた均一な溶液あるいは懸

濁液を凍結乾燥して得たスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

28) コラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、これに必要に応じて添加剤を溶解し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得た粉末に水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

29) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液に、所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得た粉末に水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

30) コラーゲン溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えて混合し、得られた均一な溶液を噴霧乾燥して得た粉末に水等を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

31) 必要に応じて添加剤を添加したコラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品に所望のオリゴヌクレオチド溶液を加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；

32) コラーゲン溶液を乾燥し、得られた乾燥品を必要に応じて添加剤を添加した所望のオリゴヌクレオチド溶液に加えた後、練合し、ノズルから円柱状に押し出し、乾燥する方法；などが挙げられる。

### 【0032】

#### 【実施例】

以下に実施例および試験例を挙げて本発明を詳しく説明するが、本発明はこれら実施例および試験例により限定されるものではない。

#### 実施例1

線維芽細胞増殖因子HST-1 (FGF4) の遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)に記載)の4196bから4216bまでの配列に相補的な配列を有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTCT-3',分子量:約6500)(サワデー株式会社)を最終濃度10マイクロモル/Lの濃度となるようにアテロコラーゲンの中性溶液((株)高研製アテロコラーゲンインプラント:2%アテロコラーゲン溶液)と混合することでアテロコラーゲン最終濃度が0.5%の溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を調製し

た。

### 【0033】

#### 実施例2

オルニチン脱炭酸酵素遺伝子の319bから338bまでの配列に相補的な配列を有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-ODC、5'-TCATGATTTCTTGATGTCC-3') (エスベックオリゴサービス株式会社) を終濃度5、10、15、20、25マイクロモル/Lの濃度となるようにアテロコラーゲンの中性溶液((株)高研製アテロコラーゲンインプラント:3.5w/w%アテロコラーゲン溶液、終濃度1.75w/w%)と混合することで溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を調製した。

### 【0034】

#### 実施例3

AS-ODCを終濃度10マイクロモル/Lの濃度となるようにアテロコラーゲンの中性溶液((株)高研製アテロコラーゲンインプラント:3.5w/w%アテロコラーゲン溶液、終濃度1.75w/w%)0.5マイクロLとトランスファースト(Promega)1.5マイクロLを混合してリボソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤を調製した。

### 【0035】

#### 実施例4

実施例1で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤3mLをポリスチレン製のシャーレー(直径35mm)上に流し込み、これをシリカゲルを入れたデシケーター中で水平に保って5℃で静置して徐々に乾燥させることによってコラーゲン1mgあたり32.5マイクログラムのオリゴヌクレオチドを含むフィルム状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る。

### 【0036】

#### 実施例5

実施例1で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤3mLをポリスチレンシャーレー(直径35mm)上に流し込み、これを-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥することによってコラーゲン1mgあたり32.5マイクログ

- ラムのオリゴヌクレオチドを含むスポンジ状のオリゴヌクレオチド導入製剤を得る。

### 【0037】

#### 実施例6

2 w/w%アテロコラーゲン溶液(17.5 g)に水(52.5 g)、10 mg/mLのグルコース溶液(10 mL)を加えて混合した後、5 mg/mLのホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3', 分子量: 約6500)溶液(10 mL)を加えて混合する。得られた溶液を-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥し、この凍結乾燥品に適量の蒸留水を加えて練合する。その後、練合品をノズルを通して棒状に押し出し成形し、さらに乾燥させて棒状の製剤を得る。すなわち10 mgあたり1 mgのオリゴヌクレオチドを含有する棒状の遺伝子製剤を得る。

### 【0038】

#### 参考例1

アテロコラーゲンの中性溶液を蒸留水に変えた以外は、実施例1に記載の操作に従いホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液を調製した。

### 【0039】

#### 参考例2

線維芽細胞増殖因子HST-1 (FGF4)の遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)に記載)の4196bから4216bまでの配列に相補的な配列を有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの変わりに、その配列と同じ配列を有したホスホロチオエート型センスオリゴヌクレオチド(5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3')を用いた以外は、実施例1に記載の操作に従い溶液状の組成物を得た。

### 【0040】

#### 参考例3

線維芽細胞増殖因子HST-1 (FGF4)の遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)に記載)の4196bから4216bまでの配列に相補的な配列を有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-CTCGTAGG

CGTTGTAGTTGT-3', 分子量: 約6500) を20マイクロモル/Lの濃度になるように溶解したリン酸緩衝液500マイクロLと、リポフェクトアミン (GIBCO BRL) 25マイクロLを溶解したリン酸緩衝液500マイクロLを混合し、室温で20分間、静置反応することで最終濃度10マイクロモル/Lのオリゴヌクレオチド・リボソーム製剤を得た。

#### 【0041】

##### 参考例4

AS-ODCの代わりにリン酸緩衝液を加えた以外は、実施例2に記載の操作に従いアテロコラーゲンを1.75w/w%含有するアテロコラーゲン溶液を調製した。

#### 【0042】

##### 参考例5

アテロコラーゲンの中性溶液をリン酸緩衝液に変えた以外は、実施例2に記載の操作に従いAS-ODCを10マイクロモル/Lの濃度で含有したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液を調製した。

#### 【0043】

##### 参考例6

AS-ODCの代わりに、非相同な配列を有したホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド(5'-AGTACTAAAGAACTACAAGG-3') (エスバックオリゴサービス株式会社) を10マイクロモル/Lの濃度で含有する以外は、実施例2に記載の操作に従い溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物を得た。

#### 【0044】

##### 参考例7

AS-ODCを終濃度10マイクロモル/Lとなるように、リン酸緩衝液と、トランスファスト (Promega) を溶解したリン酸緩衝液XXXマイクロLを混合することでリボソーム製剤を得た。

#### 【0045】

##### 試験例1

実施例1で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤2マイクロLを20%の仔牛血清を含むPBS(-)液100マイクロLに混合し37℃で静置した。混合後、30分、60分、180分後に混合液を分取して3%アガロースゲル電気泳動に付し、製剤中のホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの一次構造を評価した。結果を図1に示す。実施例1で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤中のホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドは、20%の仔牛血清を含むPBS(-)溶液と混合した180分後でも無処理のホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの泳動位置にバンドが認められたのに比べて、参考例1の製剤では30分後にはバンドは確認できなかった。この結果は、本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤中でホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドが酵素による分解から保護されることを示している。

#### 【0046】

##### 試験例2

10週齢のオスのヌードマウスの精巣にHST-1を産生するヒト精巣胚腫瘍細胞(NEC-8)を $10^4$ 個移植した。移植10日後に実施例1で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤をヌードマウスの精巣あたり50マイクロリットルを投与した。投与後、10日後、20日後、30日後にヌードマウスを屠殺し、精巣中の腫瘍細胞の重量を測定した。結果を図2に示す。ヌードマウスの精巣中での精巣胚腫瘍細胞の増殖は、参考例2のゲル状の組成物及び参考例3のリポソームの組成物をそれぞれ精巣あたり50マイクロリットル投与した場合に比べて、実施例1で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤を投与したヌードマウスで最も抑制された。特に、参考例3のリポソーム製剤では20日後まで実施例1のオリゴヌクレオチド導入製剤と同等の抑制効果を示したが、30日後には増殖抑制効果は見られなかった。この結果は、本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤が投与後ヌードマウスの精巣に滞留し、ヌードマウスの体内でHST-1の産生を抑制するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドを酵素による分解から保護し、このホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを局所で徐放することによって効果的にかつ長期間腫瘍細胞の増殖を抑制する効果を有することを示している。

#### 【0047】



## 試験例3

10%牛胎児血清を含むDMEM培地1mL中で培養したヒト胃癌細胞(MKN45細胞)(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団)  $5 \times 10^5$ 個に実施例2で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤(AS-ODCを10マイクロモル/L含有する)0.5マイクロLを添加し、37℃で培養した。添加24時間後にオリゴヌクレオチド導入製剤を含む培地を新鮮な培地と交換し、その後24時間毎に培地を交換して6日間培養した。添加後2日毎に細胞数をMTTアッセイにより測定した。同様に参考例4で調製したアテロコラーゲン溶液、参考例5で調製したホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液、参考例6で調製した溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物をMKN45細胞に添加して細胞数を測定した。結果を図3に示す。実施例2の溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤を添加した場合、何も添加しなかった対照群に比べてMKN45細胞の増殖が著しく抑制された。更に6日後には添加時に比べてMKN45細胞数が減少した。一方、アテロコラーゲン溶液である参考例4、AS-ODCのみを含有する参考例5、ホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチドとアテロコラーゲンを含む参考例6の製剤を添加した場合には、対照群に比べてMKN45細胞の増殖は抑制されたものの、実施例2を添加した場合に比べて抑制効果は低かった。これらの結果はホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる腫瘍細胞の増殖抑制効果は、アテロコラーゲンと混合して本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤とすることによって増強されること、また本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤による腫瘍細胞の増殖抑制機構が単にアテロコラーゲンあるいはホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドが標的細胞と共存することに由来せず、ホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる標的細胞の増殖抑制効果及び殺細胞効果に因ることを示している。

【0048】

## 試験例4

10%牛胎児血清を含むDMEM培地1mL中で培養したヒト横紋筋肉腫細胞(RD細胞)(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団)  $5 \times 10^5$ 個に実施例

2で調製した溶液状のオリゴヌクレオチド導入製剤（AS-ODCを5、10、15、20、25マイクロモル/L含有する）5マイクロLを添加し、37℃で培養した。添加24時間後にオリゴヌクレオチド導入製剤を含む培地を新鮮な培地と交換し、その後24時間毎に培地を交換して5日間培養した。添加後1、35日後に細胞の生存率をトリパンブルー染色法により測定した。結果を図4に示した。測定したすべてのオリゴヌクレオチド導入製剤でRD細胞の生存率は低下し、測定した中で最もAS-ODC濃度が低い5マイクロモル/Lのオリゴヌクレオチド導入製剤でも殺細胞効果が見られた。

#### 【0049】

##### 試験例5

10%牛胎児血清を含むDMEM培地1mL中で培養したヒト横紋筋肉腫細胞（RD細胞） $5 \times 10^5$ 個に実施例3で調製したリボソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤0.5マイクロLを添加し、37℃で培養した。添加24時間後にオリゴヌクレオチド導入製剤を含む培地を新鮮な培地と交換し、その後24時間毎に培地を交換して8日間培養した。添加2、4、6、8日後に細胞の生存率をトリパンブルー染色法により測定した。また、添加2、4、6日後にRD細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性を測定した。同様に参考例7のリボソーム製剤を添加してRD細胞の生存率及び細胞内のオルニチン脱炭酸酵素の活性を調べた。結果を図5と6に示した。実施例3のリボソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例7のリボソーム製剤共にRD細胞の生存率を低下させたが、オリゴヌクレオチド導入製剤の方が強い殺細胞効果を示した。また、同様にリボソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤とリボソーム製剤は共にRD細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性を低下させたが、オリゴヌクレオチド導入製剤の方が強く活性を低下させた。これは実施例3のリボソームを含んだオリゴヌクレオチド導入製剤が、参考例7のリボソーム製剤に比べて強く標的遺伝子であるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現を抑制し、RD細胞を減少させたことを示している。これらの結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤がリボソームを含んだ場合でも、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドによる殺細胞効果を増強し、その増強効果が従来のリボソーム製剤に比べて優れていることを示している。

## 【0050】

## 試験例6

4週齢のオスのヌードマウスの背部皮下にオルニチン脱炭酸酵素を過剰に産生するRD細胞を $5 \times 10^7$ 個移植した。移植7日後に実施例2で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤(AS-ODCを10マイクロモル/L含有する)50マイクロモル/LをRD細胞移植部位、RD細胞を移植した対側の背部筋肉内、及び腹腔内にそれぞれ投与した。同様に参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例7のリボソーム製剤及びリン酸緩衝液をそれぞれRD細胞移植部位に投与した。投与後、7日毎にヌードマウスを屠殺し、RD細胞の重量を測定した。結果を図7、8、および9に示す。ヌードマウス背部筋肉中でのRD細胞の増殖は、参考例4のアテロコラーゲン溶液(図7)、参考例7のリボソーム製剤(図8)及びリン酸緩衝液を投与した場合に比べて、実施例2で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤をRD移植部位内、RD細胞を移植した対側の背部筋肉内、及び腹腔内に投与したすべてのヌードマウスで最も抑制された(図9)。特に、参考例7のリボソーム製剤では7日後まで実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤と同等の抑制効果を示したが、14日後には増殖抑制効果は見られなかった。これらは本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤がリボソーム製剤に比べてより強力にRD細胞の増殖を抑制すること、またこのRD細胞の増殖抑制効果が長期に亘って持続すること、更に増殖抑制効果が投与部位による影響を受けないことを示している。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤が、投与後ヌードマウスの体内でホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドを酵素による分解から保護し、このホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを徐放することによって効果的にかつ長期間腫瘍細胞の増殖を抑制する効果を有することを示している。図10および11にRDを移植したヌードマウスの累積生存曲線を示した。実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をRD移植部位に投与したマウスの平均生存日数は52.6日で、リン酸緩衝液を投与したヌードマウスの平均生存日数20.5日、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与したヌードマウスの平均生存日数40.3日(図10)、参考例7のリボソーム製剤を投与したヌードマウスの平均生

存日数37、8日(図11)に比べて大幅に延長された。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤を投与して得られるRD細胞の増殖抑制効果が、RD細胞を移植したヌードマウスの延命率を高めることを示している。また、図12および13に実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例7のリボソーム製剤及びリン酸緩衝液投与後42日のRD細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素活性を示した。オリゴヌクレオチド導入製剤を投与したRD細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性は、アテロコラーゲン溶液、リボソーム製剤及びリン酸緩衝液を投与したRD細胞に比べて低かった。これはオリゴヌクレオチド導入製剤を投与することによってオルニチン脱炭酸酵素の産生が抑制されていることを示しており、オリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合にみられたRD細胞の増殖抑制効果が、オリゴヌクレオチド導入製剤中に含まれるホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドによるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現抑制によるものであることを示している。

#### 【0051】

##### 試験例7

4週齢のオスのヌードマウスの背部皮下にオルニチン脱炭酸酵素を過剰に産生するMKN45細胞を $5 \times 10^7$ 個移植した。移植7日後に実施例2で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤(AS-ODCを10マイクロモル/L含有する)50マイクロLをMKN45細胞移植部位に投与した。同様に参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物及びリン酸緩衝液をそれぞれMKN45細胞移植部位に投与した。投与後、7日毎にヌードマウスを屠殺し、MKN45細胞の重量を測定した。結果を図14に示す。ヌードマウス背部筋肉中でのMKN45細胞の増殖は、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物及びリン酸緩衝液を投与した場合に比べて、実施例2で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤をMKN45細胞移植部位に投与した場合に最も抑制された。これは本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤がMKN45細胞の増殖を抑制すること、またこのMKN45細胞の増殖抑制効果が長期に亘って持続することを示している。図15にMKN細胞を移植したヌー

ドマウスの累積生存曲線を示した。実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をMKN細胞移植部位に投与したヌードマウスの平均生存日数は48.5日で、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与したヌードマウスの平均生存日数39.1日、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物を投与したヌードマウスの平均生存日数39.1日、リン酸緩衝液を投与したヌードマウスの平均生存日数21.3日に比べて大幅に延長された。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤を投与して得られるMKN細胞の増殖抑制効果が、MKN細胞を移植したヌードマウスの延命率を高めることを示している。また、図16に実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6の溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物及びリン酸緩衝液投与後35日のMKN45細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素活性を示した。オリゴヌクレオチド導入製剤を投与したMKN45細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性は、アテロコラーゲン溶液、溶液状のホスホロチオエート型スクランブルオリゴヌクレオチド組成物及びリン酸緩衝液を投与したMKN45細胞に比べて顕著に低かった。これはオリゴヌクレオチド導入製剤を投与することによってオルニチン脱炭酸酵素の産生が抑制されていることを示しており、オリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合にみられたMKN45細胞の増殖抑制効果が、オリゴヌクレオチド導入製剤中に含まれるホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドによるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現抑制によるものであることを示している。

#### 【0052】

##### 試験例8

4週齢のオスのヌードマウスの背部皮下にオルニチン脱炭酸酵素を過剰に産生するヒト大腸癌細胞（COLO201細胞）（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団）を $5 \times 10^7$ 個移植した。移植7日後に実施例2で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤（AS-ODCを10マイクロモル/L含有する）50マイクロLをCOLO201細胞移植部位に投与した。同様に参考例4で調製したアテロコラーゲン溶液及びリン酸緩衝液をそれぞれCOLO201細胞移植部位に投与した。投与後、7日毎にヌードマウスを屠殺し、COLO201細胞の重量を測

定した。結果を図17に示す。ヌードマウス背部筋肉中でのCOLO201細胞の増殖は、参考例4のアテロコラーゲン溶液及びリン酸緩衝液を投与した場合に比べて、実施例2で調製したオリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合に最も抑制され、かつCOLO201細胞の重量は移植時より減少した。これらは本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤がCOLO201の増殖を抑制すると共にCOLO201細胞を死滅させること、またこのCOLO201細胞の増殖抑制効果が長期に亘って持続することを示している。図18にCOLO201細胞を移植したヌードマウスの累積生存曲線を示した。実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をCOLO201細胞移植部位に投与したマウスの平均生存日数は39.8日で、アテロコラーゲン溶液及びリン酸緩衝液を投与したヌードマウスのそれぞれの平均生存日数31.2日及び20.6日に比べて延長された。この結果は本発明のオリゴヌクレオチド導入製剤を投与して得られるCOLO201の増殖抑制効果が、COLO201を移植したヌードマウスの延命率を高めることを示している。また、図19に実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤、参考例4のアテロコラーゲン溶液及びリン酸緩衝液投与後35日のCOLO201細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素活性を示した。オリゴヌクレオチド導入製剤を投与したCOLO201細胞内のオルニチン脱炭酸酵素活性は、アテロコラーゲン溶液及びリン酸緩衝液を投与したCOLO201細胞に比べて低かった。これはオリゴヌクレオチド導入製剤を投与することによってオルニチン脱炭酸酵素の産生が抑制されていることを示しており、この結果はオリゴヌクレオチド導入製剤を投与した場合にみられたCOLO201細胞の増殖抑制効果が、オリゴヌクレオチド導入製剤中に含まれるホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドによるオルニチン脱炭酸酵素遺伝子の発現抑制によるものであることを示している。

### 【0053】

#### 【発明の効果】

標的m-RNAと相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとコラーゲン（更に医療上許容される添加剤）からなる製剤が、in vivoで副作用を誘発することなく標的m-RNAの発現を効果的に抑制し、かつ長期にその効果が維持されることにより、遺伝子治療が可能となった。

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】** 試験例1における3%アガロースゲル電気泳動図である。実施例1と参考例1のオリゴヌクレオチド製剤中でのホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼによる影響を示している。レーン1：実施例1-0分後、レーン2：実施例1-30分後、レーン3：実施例1-60分後、レーン4：実施例1-180分後、レーン5：参考例1-0分後、レーン6：参考例1-30分後、レーン7：参考例1-60分後、レーン8：参考例1-180分後。

**【図2】** 実施例1のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト精巣腫瘍細胞(NEC-8)を移植したヌードマウスの精巣に投与した場合、NEC-8細胞の増殖を長期間抑制したことを示したグラフである。

**【図3】** 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞にin vitroで添加した場合に、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例5のアンチセンスオリゴヌクレオチド溶液、参考例6のスクランブルオリゴヌクレオチド組成物を添加した場合に比べて、ヒト胃癌細胞の増殖を抑制し、かつ細胞数を減少させたことを示したグラフである。

**【図4】** 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤によるin vitroにおけるヒト横紋筋肉腫細胞の増殖抑制効果を、オリゴヌクレオチド導入製剤に含有するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度で比較したグラフである。

**【図5】** 実施例3のリボソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞にin vitroで添加した場合、試験例7のリボソーム製剤に比べて強い殺細胞効果を示したグラフである。

**【図6】** 実施例3のリボソームを含有したオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞にin vitroで添加した場合、試験例7のリボソーム製剤に比べて強くオルニチン脱炭酸酵素の活性を低下させたことを示すグラフである。

**【図7】** 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液に比べて長期間横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制したことを示すグラ

フである。

【図8】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫移植部位に投与した場合、参考例7のリボソーム製剤に比べて長期間横紋筋肉腫細胞の増殖を抑制したことを示すグラフである。

【図9】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫移植部位、横紋筋肉腫を移植した対側の背部筋肉内、腹腔内に投与した場合、リボソーム製剤を横紋筋肉腫移植部位に投与した場合に比べてすべての部位で横紋筋肉腫細胞の増殖を長期間抑制したことを示したグラフである。

【図10】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べてヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

【図11】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例7のリボソーム製剤を投与した場合に比べてヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

【図12】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて横紋筋肉腫細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

【図13】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト横紋筋肉腫細胞を移植したヌードマウスの横紋筋肉腫細胞移植部位に投与した場合、参考例7のリボソーム製剤を投与した場合に比べて横紋筋肉腫細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

【図14】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞を移植したヌードマウスのヒト胃癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6のオルニチン脱炭酸酵素の遺伝子配列に非相同な配列を



有したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを含有する溶液状組成物を投与した場合に比べて、ヒト胃癌細胞の増殖を長期間抑制したことを示したグラフである。

【図15】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞を移植したヌードマウスのヒト胃癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6のオルニチン脱炭酸酵素の遺伝子配列に非相同な配列を有したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを含有する溶液状組成物を投与した場合に比べてヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

【図16】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト胃癌細胞を移植したヌードマウスの胃癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液、参考例6のオルニチン脱炭酸酵素の遺伝子配列に非相同な配列を有したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを含有する溶液状組成物を投与した場合に比べて胃癌細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

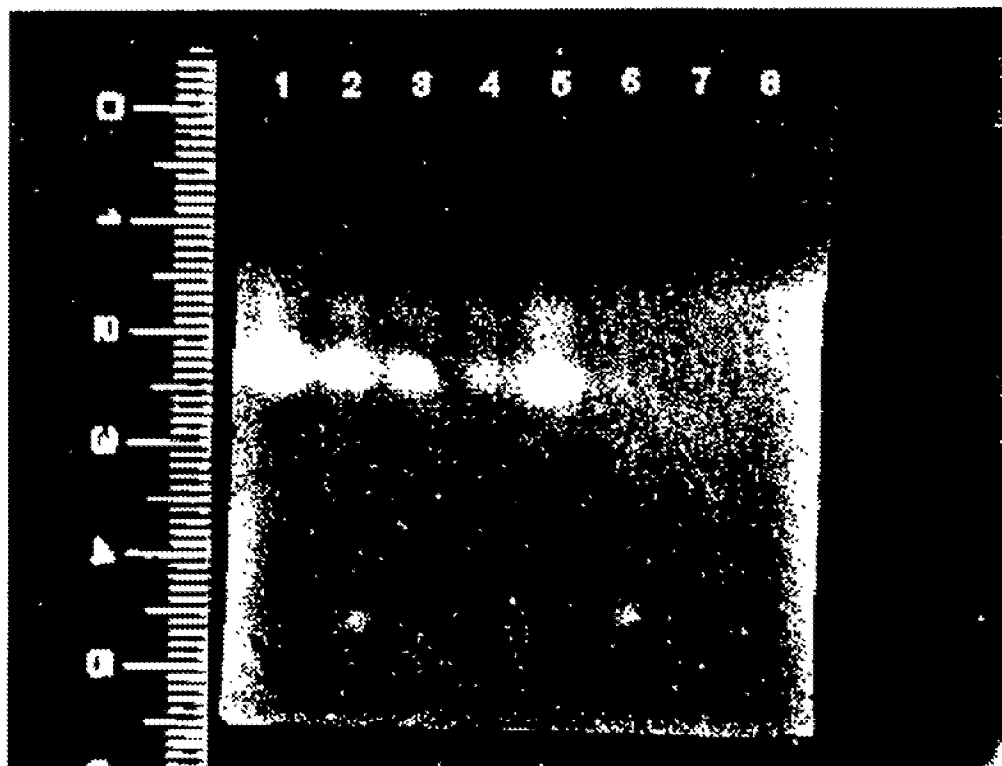
【図17】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト大腸癌細胞を移植したヌードマウスの大腸癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて、大腸癌細胞の増殖を長期間抑制したことを示したグラフである。

【図18】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト大腸癌細胞を移植したヌードマウスの大腸癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて、ヌードマウスの延命率を高めたことを示したグラフである。

【図19】 実施例2のオリゴヌクレオチド導入製剤をヒト大腸癌細胞を移植したヌードマウスの大腸癌細胞移植部位に投与した場合、参考例4のアテロコラーゲン溶液を投与した場合に比べて、大腸癌細胞内でのオルニチン脱炭酸酵素の産生が強く抑制されたことを示したグラフである。

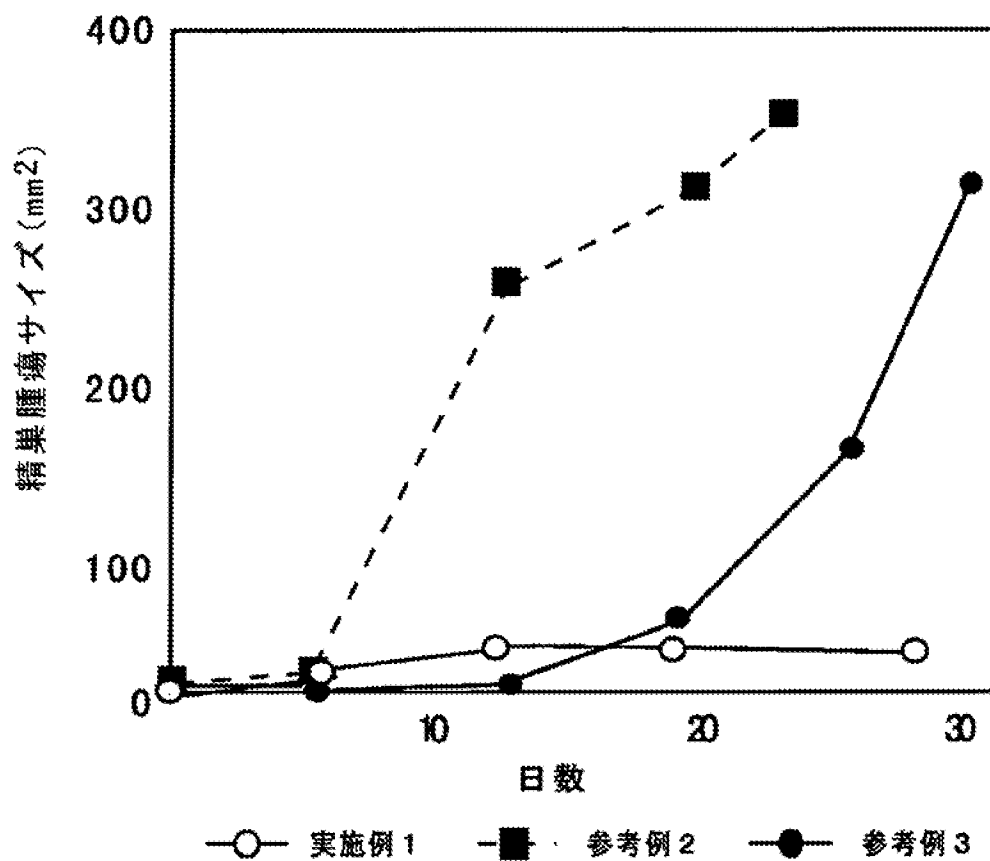
【書類名】 図面

【図1】



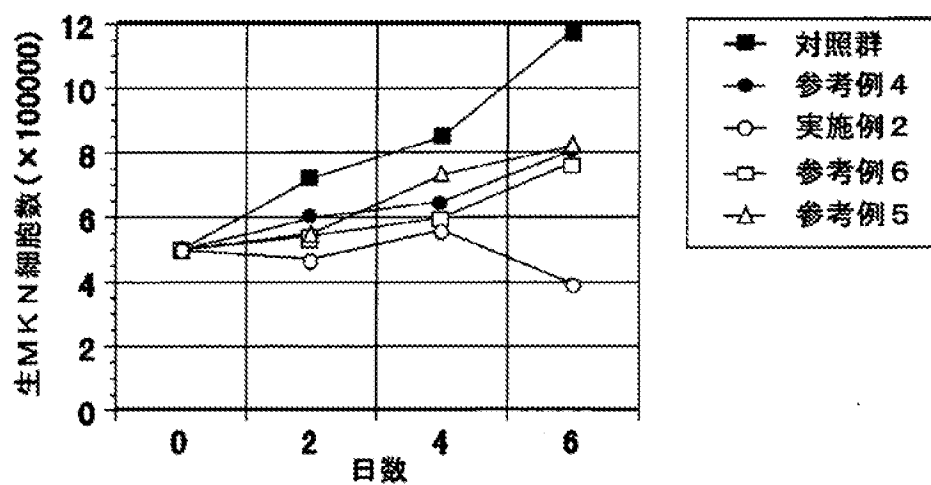
【図2】

図2



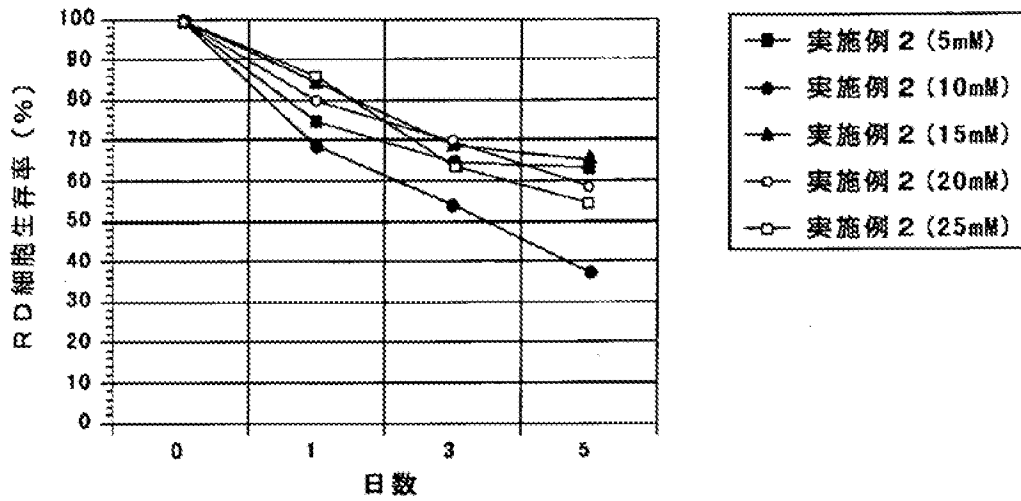
【図3】

図3



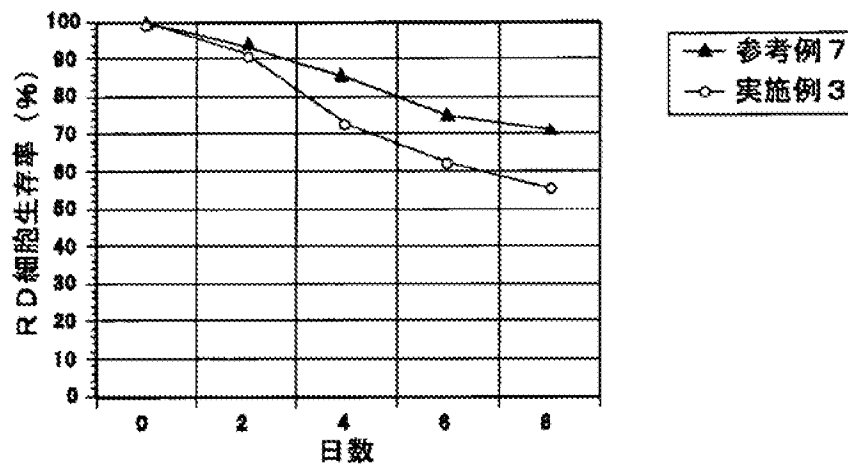
【図4】

図 4



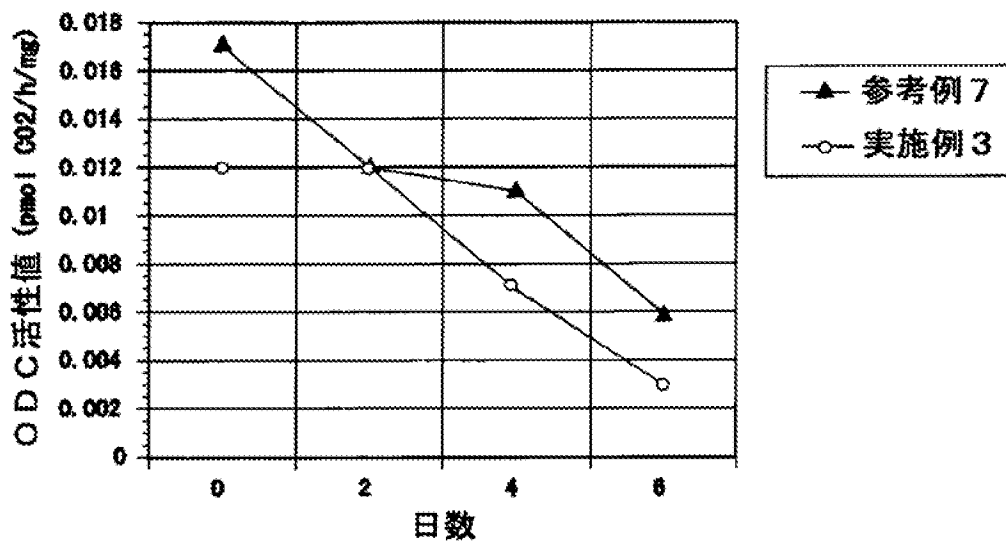
【図5】

図5



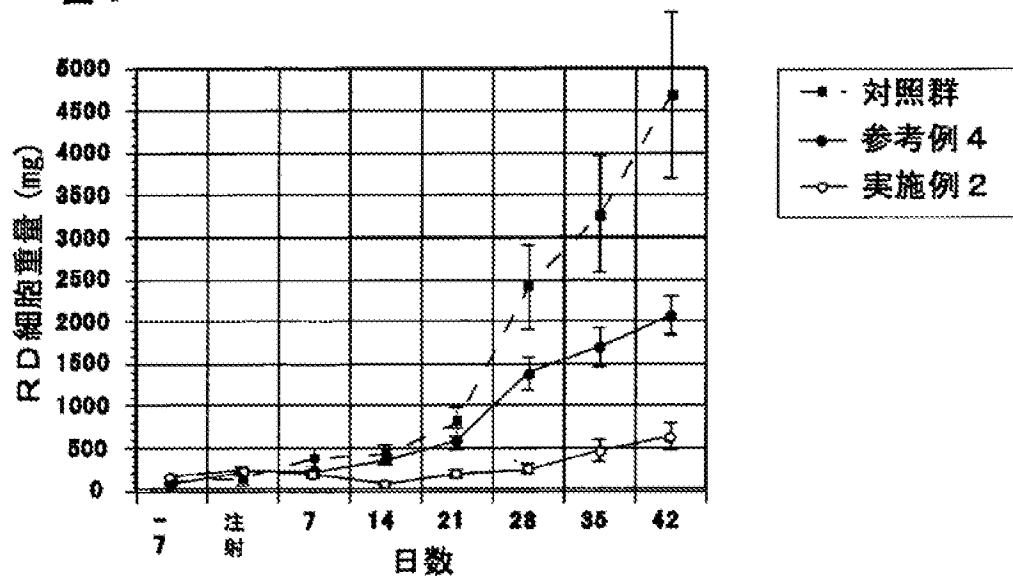
【図6】

図6



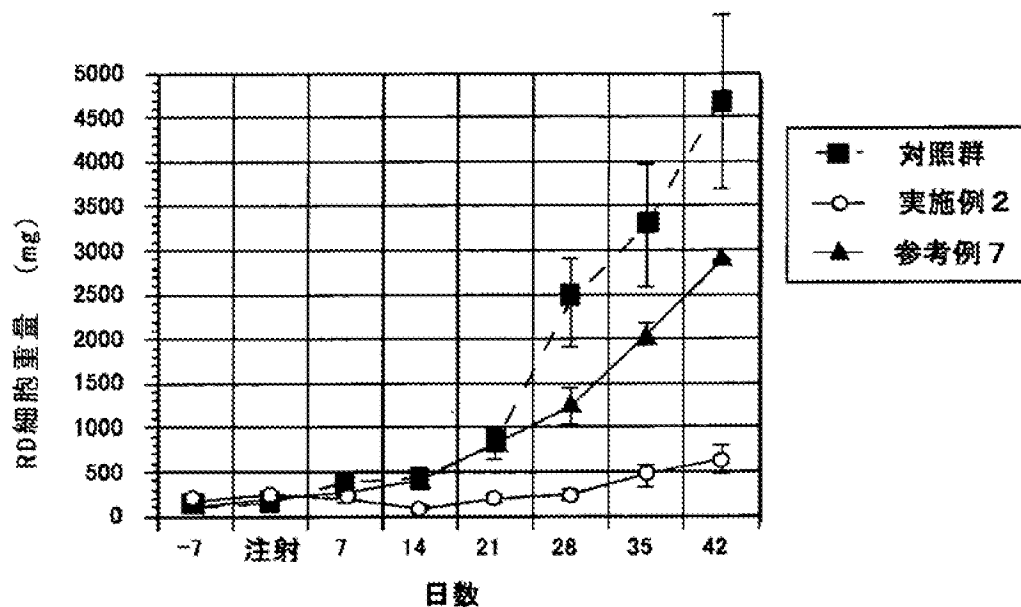
【図7】

図7



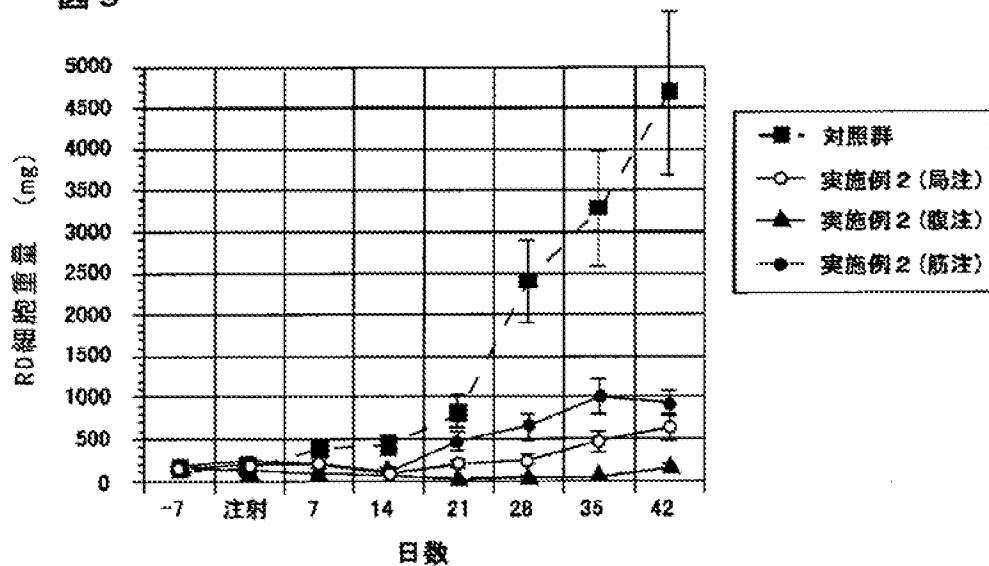
【図8】

図8



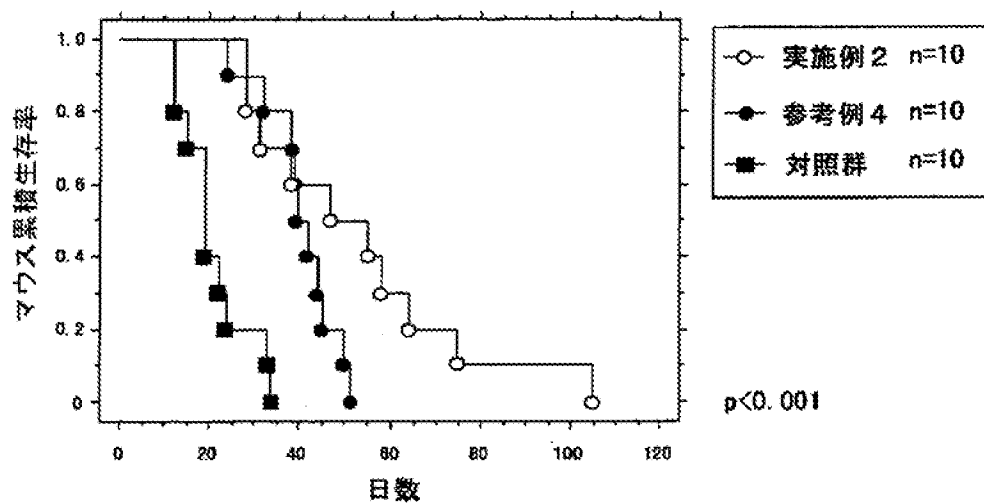
【図9】

図9



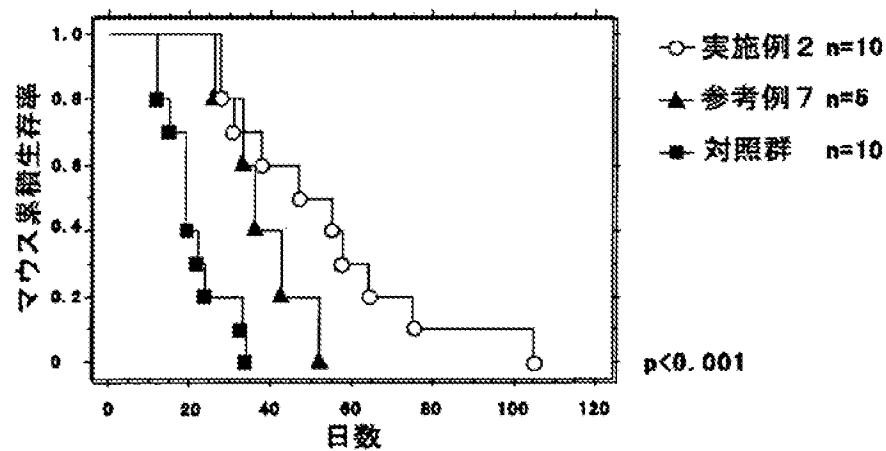
【図 10】

図 10



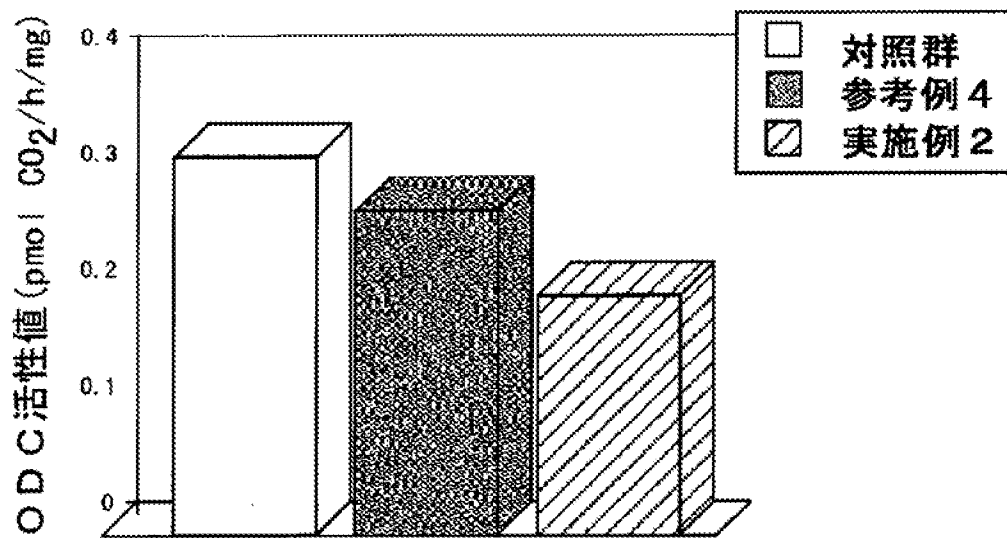
【図 11】

図 11



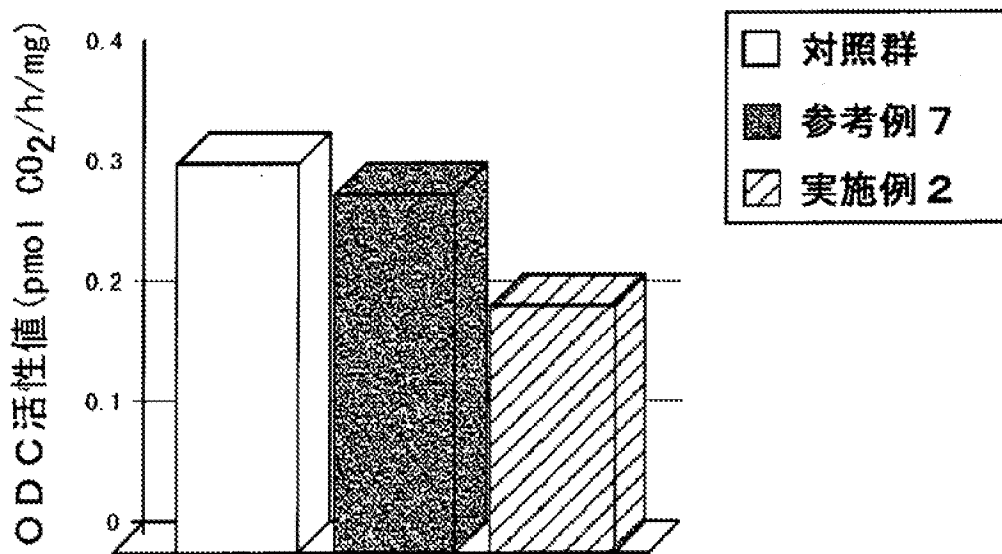
【図12】

図12



【図13】

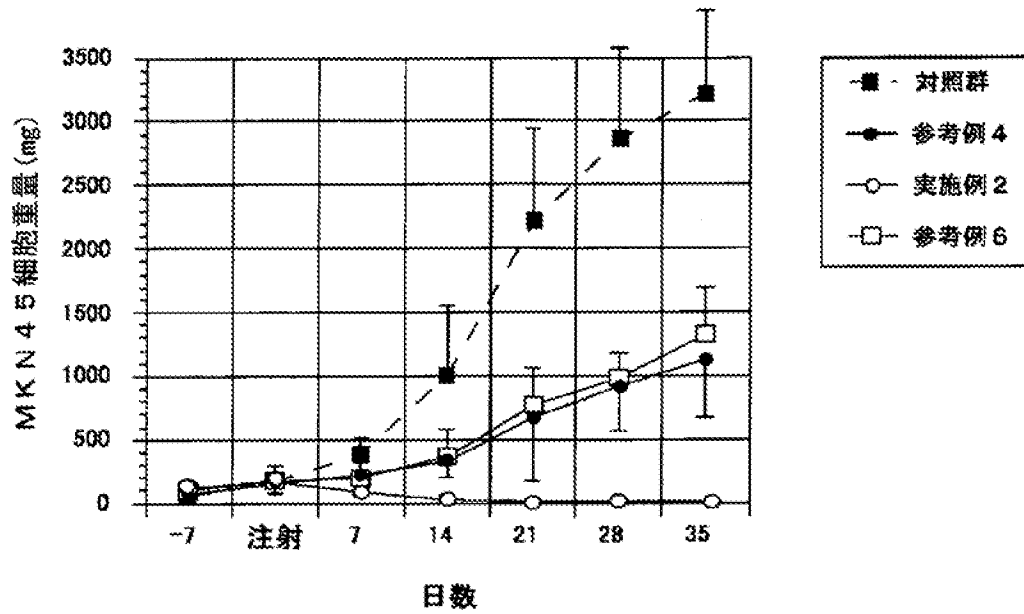
図13





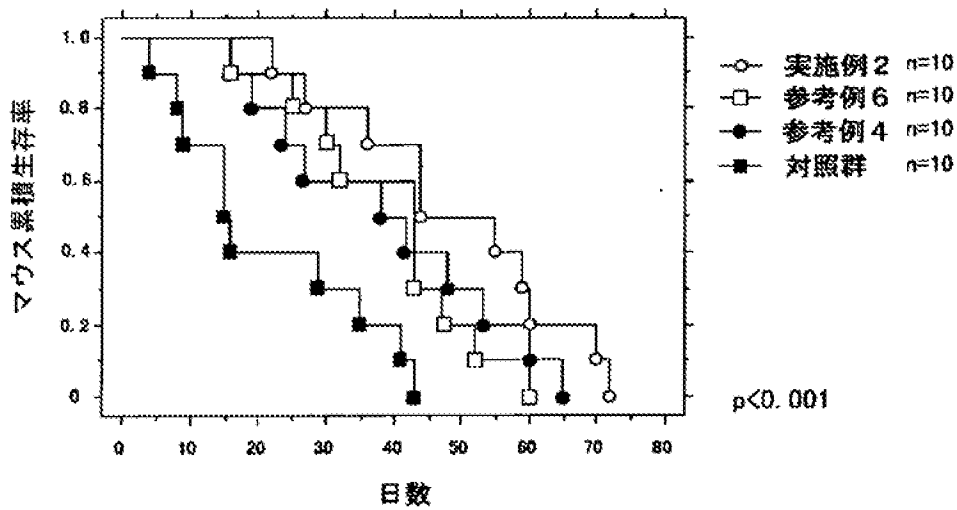
【図14】

図14



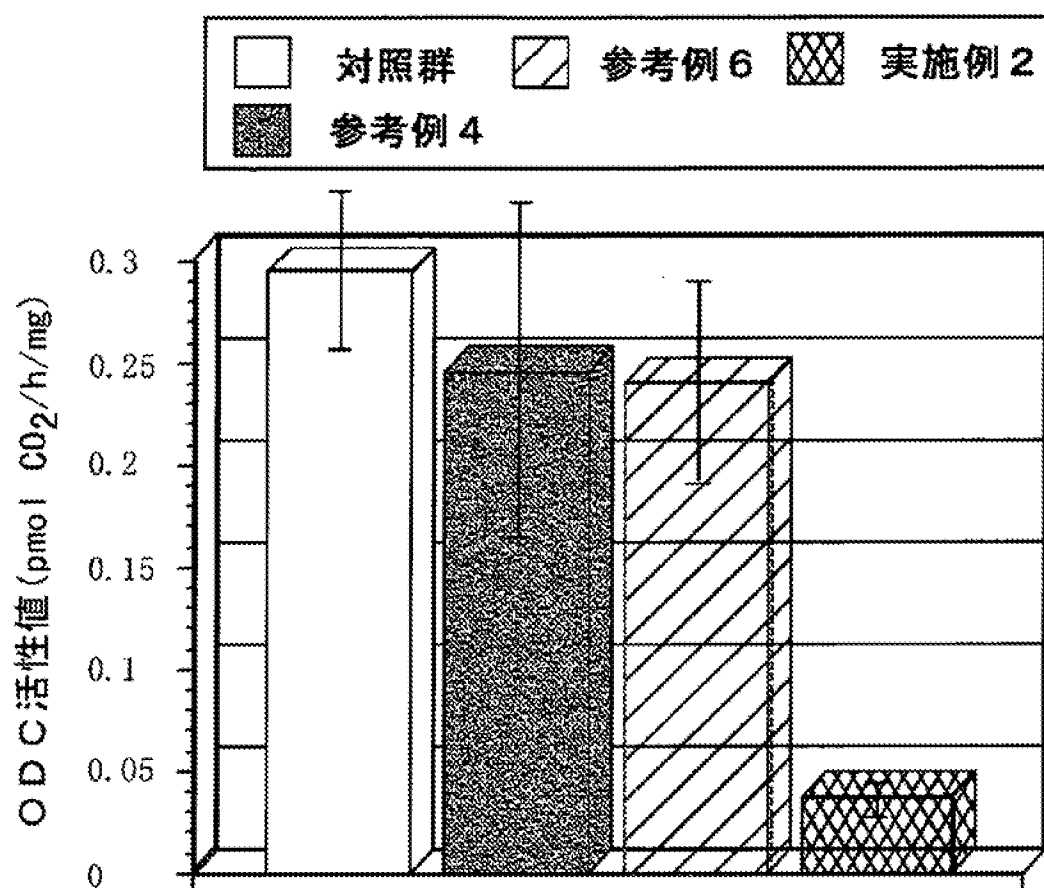
【図15】

図15



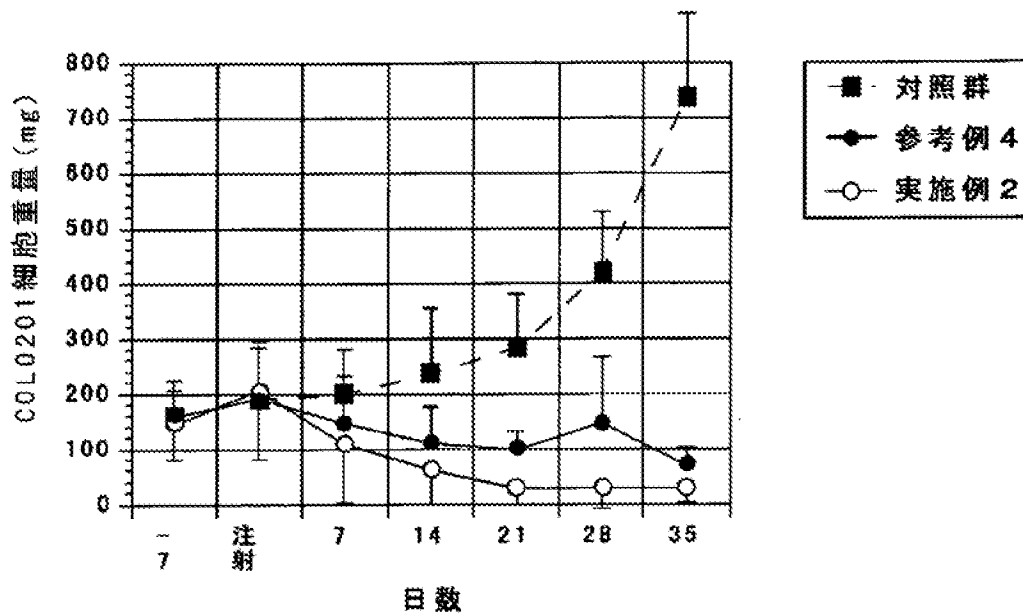
【図 16】

図 16



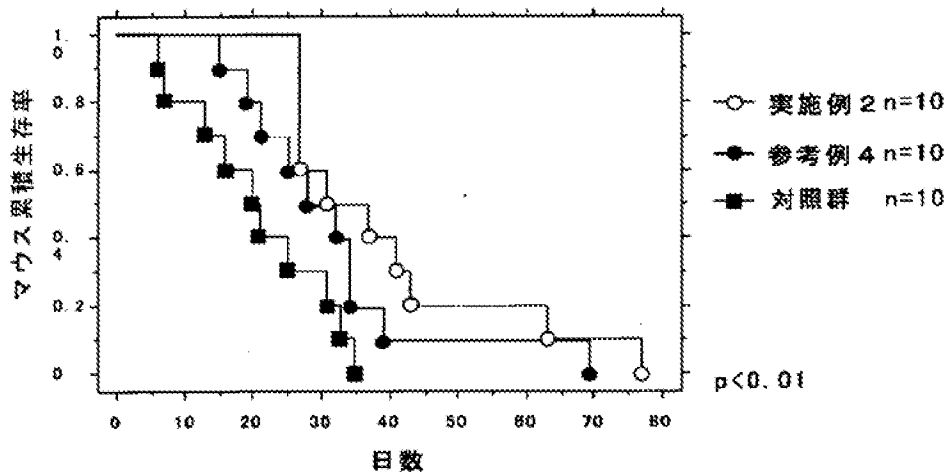
【図17】

図 1 7



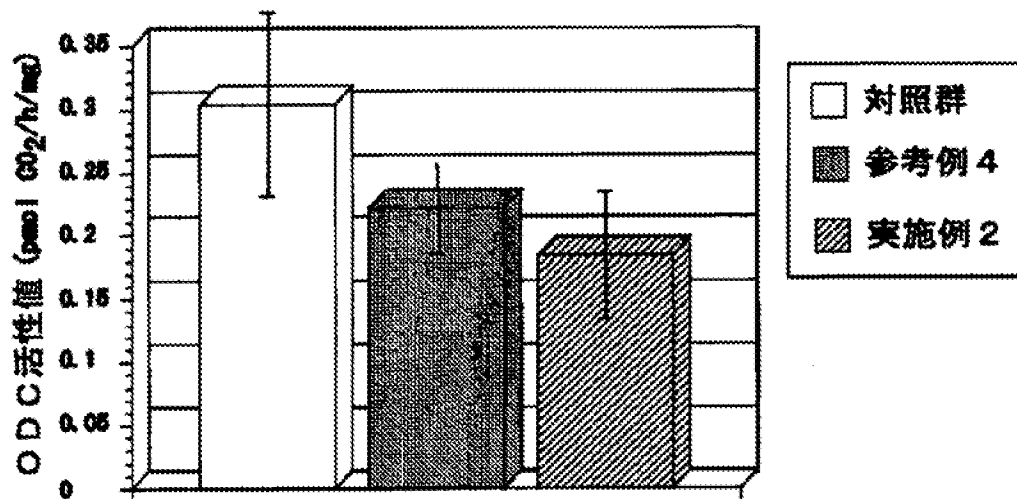
【図18】

図 1 8



【図19】

図19



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、アンチセンス療法等に必要なオリゴヌクレオチドを細胞に効率よく導入できる製剤を提供し、種々の疾患を治療することにある。

【解決手段】 コラーゲンを必須成分とする動物細胞への所望のオリゴヌクレオチド導入製剤は上記課題を解決する。

【選択図】 なし

特願 2000-184502

出願人履歴情報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名 住友製薬株式会社

特願2000-184502

出願人履歴情報

識別番号 [591071104]

1. 変更年月日 1991年 4月 8日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都新宿区下落合3丁目5-18  
氏 名 株式会社高研
2. 変更年月日 2001年 1月19日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都豊島区目白3丁目14番3号  
氏 名 株式会社高研

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true  
copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: June 20, 2000

Application Number: Patent Application No. 2000-184502

Applicant: SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED  
KOKEN CO., LTD.

Commissioner,  
Patent Office

(Seal)



Document Name: Application for Patent  
Docket No.: 171195  
Date of Filing: June 20, 2000  
Addressee: Commissioner, Patent Office  
International Patent  
Classification: A61K 48/00

Inventor:

Address: c/o Graduate School of  
Medicine, the University of  
Tokyo,  
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku,  
Tokyo-to

Name: Shunichiro KUBOTA

Inventor:

Address: c/o National Cancer Center,  
5-5-1, Tsukiji, Chuo-ku,  
Tokyo-to

Name: Masaaki TERADA

Inventor:

Address: c/o National Cancer Center  
Research Institute,  
5-5-1, Tsukiji, Chuo-ku,  
Tokyo-to

Name: Takahiro OCHIYA

Inventor:

Address: c/o Research Institute of  
KOKEN CO., LTD.,  
2-11-21, Nakane, Meguro-ku,  
Tokyo-to

Name: Hiroshi ITOH

Inventor:

Address: c/o Research Institute of  
KOKEN CO., LTD.,  
2-11-21, Nakane, Meguro-ku,  
Tokyo-to

Name: Masayasu FURUSE

Inventor:

Address: c/o SUMITOMO PHARMACEUTICALS  
COMPANY, LIMITED,  
3-45, Kurakakiuchi 1-chome,  
Ibaraki-shi, Osaka-fu

Name: Akihiko SANO

Inventor:

Address: c/o SUMITOMO PHARMACEUTICALS  
COMPANY, LIMITED,  
3-45, Kurakakiuchi 1-chome,  
Ibaraki-shi, Osaka-fu

Name: Shunji NAGAHARA

Applicant:

Identification No.: 000183370

Address: 2-8, Dosho-machi 2-chome,  
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka-fu

Name: SUMITOMO PHARMACEUTICALS  
COMPANY, LIMITED

Applicant:

Identification No.: 591071104

Address: 5-18, Shimoochiai 3-chome,  
Shinjuku-ku, Tokyo-to

Name: KOKEN CO., LTD

Agent:

Identification No.: 100062144

Patent Attorney:

Name: Tamotsu AOYAMA

Appointed Agent:

Identification No.: 100068526

Patent Attorney:

Name: Yasuo TAMURA

Attached documents:

Item:	Specification	1 copy
Item:	Drawings	1 copy
Item:	Abstract	1 copy

Registration No. of General Power:	9809450
---------------------------------------	---------

Registration No. of General Power:	9809905
---------------------------------------	---------

Request for proof transmission:	Yes
------------------------------------	-----

Document name: Specification

Title of the invention: OLIGONUCLEOTIDES-TRANSFERRING  
PREPARATIONS

What is claimed is:

1. A preparation for transferring a desired oligonucleotide into a target cell, which comprises a collagen as an essential component.

2. A preparation according to Claim 1, wherein the target cell is animal cell.

3. A preparation according to Claim 2, wherein the target cell is an organ or a tissue which requires to be treated, or its cell around.

4. A preparation according to any one of Claims 1 to 3, wherein the collagen is atelocollagen.

5. A preparation according to any one of Claims 1 to 5, wherein the molecular weight of the collagen is from about 300,000 to about 900,000.

6. A preparation according to any one of Claims 1 to 5, wherein the preparation is a sustained-release formulation.

7. A preparation according to any one of Claims 1 to 6, wherein the oligonucleotide is from 5 mer to 30 mer in length.

8. A preparation according to Claim 6 or 7, wherein the oligonucleotide is a DNA or a DNA derivative.

9. A preparation according to Claim 7 or 8, wherein the oligonucleotide is an RNA or an RNA derivative.

10. A preparation according to Claim 8 or 9, wherein the DNA derivative or the RNA derivative has at least one phosphorothioate bond.

Detailed explanation of the invention:

[0001]

Technical field to which the invention pertains:

The present invention relates to preparations for transferring oligonucleotides into a target cell which comprise a collagen as an essential component, said preparations being used in an antisense therapy. More specifically, the present invention relates to a safe preparation comprising a collagen as an essential component, whereby oligonucleotides can be efficiently transferred into a target cell.

[0002]

Prior art:

With rapid progress in the recent technique for analysis of genetic information, information of gene that causes disease has been accumulated. For example, information on genes essential for growth or survival of bacteria and viruses has been clarified in the field of infectious diseases. Moreover, in various diseases, information on disease-related genes, and on their over-

expression and mutations has been clarified, and the relation between such genetic information and the mechanism of pathogenesis has been elucidated.

[0003]

Antisense therapy is a method of controlling or inhibiting the expression of the disease-related gene information as shown above, and treating or preventing the diseases.

Specifically, it comprises:

- (1) administering an about 10 to 30 mer oligonucleotide comprising a base sequence complementary to a m-RNA or a m-RNA precursor of genes, of which the expression is to be controlled or inhibited;
- (2) allowing the oligonucleotide to form double strand together with the m-RNA or m-RNA precursor in cells; and
- (3) inhibiting the translation of m-RNA by ribosome, or inhibiting the cleavage of double strand by RNase H, or the splicing of m-RNA precursor; whereby suppressing gene expressions.

In addition, there exists a method which comprises directly linking to the double-stranded DNA of the target gene to form a triple strand, whereby inhibiting the transcription into m-RNA.

[0004]

Antisense therapy has been intensively studied

since it had been proposed in the latter 1970s by Ts'0 and Miller et al., Biochemistry, 16, 1988-1996, 1977; and Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280-284, 1978. Originally, studies on antisense therapy were performed using oligonucleotides of native DNA or RNA. However, they have some problems such as:

- (1) rapid degradation and inactivation of native oligonucleotides due to endogenous nucleases;
- (2) difficulty for negatively charged oligonucleotides to penetrate through cell membrane into cells due to negatively charged membrane; and the like.

Considering such problems, variously modified oligonucleotides having the basic structure of DNA or RNA have been developed and utilized. Among these modified oligonucleotides, phosphorothioate-type oligonucleotides are the most practical ones, wherein diester bonds between respective nucleosides are substituted with phosphorothioate bonds (hereinafter referred to as S-oligonucleotide). S-oligonucleotides have been utilized in most of clinical trials that were conducted until now.

[0005]

However, even S-oligonucleotides have the following problems:

- (1) that they are degraded and inactivated by endogenous nuclease, although not so rapidly as native

oligonucleotides;

(2) that they have a less ability to form a double strand together with m-RNA compared to native oligonucleotides;

(3) that they should be administered to the target cells at higher concentration because of their low ability to form a double strand;

(4) that they cause release of cytokines, inhibition of blood coagulations, activation of complements, and allergic reaction or the like when administered systemically at higher concentration;

(5) that they specifically or non-specifically bind endogenous proteins, and consequently could not form a double strand with the target m-RNA but produce non-specific effects.

They fail to completely satisfy the requirements of antisense therapy, thus they have not been practically utilized. These problems are true not only for oligonucleotides used as the first generation of S-oligonucleotides, but so-called the second and the third generation for antisense therapy, which have been developed until now (Kazunari Yokoyama, Kagaku-to-Seibutsu, 36, 556-559, 1998). Because of the problems, it has been generally recognized that suppression of target gene expression using oligonucleotides would not provide good results *in vivo*, particularly in clinical trials, even though it could



provide good results in vitro. Actually, clinical trials for antisense drugs often suspended because they fail to show good results.

[0006]

Murakami reported that the suspension of clinical trials would be caused by the problem in delivery of antisense drugs, and the successful development of antisense drugs depends on the development of delivery methods (Akira Murakami, *Seitai-no-Kagaku*, 49, 309-314, 1998). The methods to deliver oligonucleotides have been intensively investigated mainly aiming at improvement in penetration and transportation of oligonucleotides into cells. To solve such problems, the following methods were proposed in Yokoyama's review (Kazunari Yokoyama, *Cellular Engineering*, 16, 1463-1473, 1997):

- (1) to conjugate oligonucleotides with poly-charged compounds such as poly-L-lysine and polyethyleneimine;
- (2) to use transferrin/poly-L-lysine-conjugated DNAs in the presence of capsid of replication-defective adenovirus;
- (3) to use fragments of the homeo domains of membrane-fused peptide derived from influenza virus HA surface protein (Bongartz, J.P. et al., *Nucleic Acids Research*, 22, 4681-4688, 1994) and Antennapedia protein of *Drosophila*;
- (4) to bind oligonucleotides with folic acid or acialoglycoprotein receptor, or transferrin, so as to be

targeted to specific cell surface receptors;  
(5) to conjugate oligonucleotides with cholesterol;  
(6) to encapsulate oligonucleotides into cationic lipids, and the like. These proposals mainly aim at improving penetration and transportation of oligonucleotide into cells, and *in vitro* experiments wherein oligonucleotides can be directly administered to cells, have provided good results. However, *in vivo* experiments have failed to show sufficient results, and have been hard to be practically utilized.

[0007]

For example, the methods comprising administering oligonucleotides encapsulated into cationic lipids (i.e., liposomes) have been intensively studied since they efficiently transfer oligonucleotides into cells. However, those methods have problems, for example, that oligonucleotides fail to exert on target cells at high concentration because they diffuse throughout the body immediately after administration, that proteins existing in the body bind to the liposome to inhibit adhesion to target cells, and that cationic lipids constituting the liposome may have cytotoxicity, and thus they have failed to provide practically successful results. Actually, clinical trials using S-oligonucleotides have never utilized any liposome (Seitai-no-kagaku, 49, 309-314, 1998). There still exist

needs for development of practical methods for delivering oligonucleotides.

[0008]

On the other hand, a method for transferring a gene wherein a plasmid DNA or an viral vector is gradually released from biocompatible or bone-compatible materials has been described in Japanese Patent Publication (kokai) No. H09-71542, and USP No. 5,763,416. These documents describe that biocompatible or bone-compatible materials gradually release plasmid DNAs having a molecular weight from 2,650,000 to 5,300,000 (corresponding to 4,000 bp - 8,000 bp) or a viral vectors with the larger molecular size to exhibit good expression efficiencies. However, the number of plasmid DNAs or viral vectors to be transferred into one target cell, to which these plasmid DNAs or viral vectors are required to be transferred, is considerably smaller compared to the number of oligonucleotides required to be transferred in antisense therapy. It is sufficient to introduce one plasmid DNA or viral vector into a single target cell, because information on genes encoded in the plasmid DNA or viral vector is transcribed to many m-RNAs and expressed after they are introduced into the target cell. On the other hand, in order to transfer oligonucleotides into cells and form rigid double strands to suppress the gene expression in antisense therapy,

oligonucleotide concentration in cells should be raised as high as possible. The Japanese Patent Publication (kokai) H09-71542 and USP No. 5,763,416 as shown above suggest specifically neither that biocompatible or bone-compatible materials gradually release oligonucleotides extremely smaller (single stranded, having a molecular weight of about 3,300 to about 9,900) compared to the plasmid DNAs or viral vectors and could inhibit the gene expression, nor that oligonucleotide concentration in the target cell could be raised to a clinically sufficient level.

[0009]

Moreover, the above publications do not suggest any preparation to transfer oligonucleotides, which can be used in antisense therapy, and have the properties as described below:

- 1) to protect oligonucleotides administered to living bodies from degradation with nucleases;
- 2) to protect oligonucleotide administered to living bodies from specific or non-specific binding with endogenous proteins;
- 3) to maintain a high concentration of oligonucleotides around the target cells in order to increase an oligonucleotide concentration in the cells so that the expression of a target m-RNA is inhibited by forming a rigid double strand;

4) to restrict such a high concentration of oligonucleotide only to the cells around the target cells in order not to produce systemic side effects; and

5) to be required to extend the period of time when the m-RNA expression could be suppressed upon a single dosage.

[0010]

Problem to be solved by the invention:

The object of the present invention is to provide a preparation for transferring efficiently an oligonucleotide necessary in antisense therapy into cells, thus contributing to the treatment of various diseases.

[0011]

Means of solving the problem:

The inventors of the present application studied intensively to solve the above problems. As the results, we have found that a preparation which comprises an oligonucleotide having a base sequence complementary to a sequence of a target m-RNA and a collagen (as well as a pharmaceutically acceptable additive) efficiently inhibits the expression of the target m-RNA without inducing any side effect *in vivo*, and maintains its effect for a long period of time. The inventors have conducted further study and accomplished the present invention.

[0012]

Accordingly, the present invention relates to:

- (1) A preparation for transferring a desired oligonucleotide into a target cell, which comprises a collagen as an essential component;
- (2) The preparation according to (1) wherein the target cell is an animal cell;
- (3) The preparation according to (2) wherein the target cell is an organ or a tissue which requires to be treated, or its cell around;
- (4) The preparation according to any one of (1) to (3) wherein the collagen is atelocollagen;
- (5) The preparation according to any one of (1) to (4) wherein the molecular weight of the collagen is from about 300,000 to about 900,000;
- (6) The preparation according to any one of (1) to (5) wherein the preparation is a sustained-release formulation;
- (7) The preparation according to any one of (1) to (6) wherein the oligonucleotide is from 5 to 30 mer in length;
- (8) The preparation according to (6) or (7) wherein the oligonucleotide is a DNA or a DNA derivative;
- (9) The preparation according to (7) or (8) wherein the oligonucleotide is an RNA or an RNA derivative;
- (10) The preparation according to (8) or (9) wherein the DNA derivative or the RNA derivative has at least one phosphorothioate bond;
- (11) The preparation according to any one of (1) to (10),

wherein the oligonucleotide at least a portion of which contains a base sequence that binds complementarily under physiological conditions to a sense or antisense strand of a gene encoding a protein that exhibits a physiological effect to disrupt the homeostasis of a living body;

(12) The preparation according to any one of (1) to (10), wherein the oligonucleotide at least a portion of which contains a base sequence that binds complementarily under physiological conditions to a sense or antisense strand of a gene that is specific to a pathogenic virus or a pathogenic bacterium;

(13) The preparation according to any one of (1) to (10), wherein the oligonucleotide contains a sequence complementary to a region containing an initiation codon of a messenger RNA or to a splicing site of a messenger RNA precursor;

(14) The preparation according to (11) wherein the gene encoding a protein that exhibits a physiological effect to disrupt the homeostasis is a cancer gene;

(15) The preparation according to (14), wherein the cancer gene is selected from a group consisting of growth factors, receptor-type tyrosine kinases, non-receptor-type tyrosine kinases, GTP-binding proteins, serine-threonine kinases, and transcription factors;

(16) The preparation according to (14) wherein the cancer

gene is a gene encoding hst-1 or ornithine decarboxylase;

(17) The preparation according to any one of (1) to (11) wherein the oligonucleotide is contained in a material that promotes the transfer of an oligonucleotide into cells or the transportation to nucleus, or wherein the oligonucleotide is complexed with the material;

(18) The preparation according to (17) wherein the material that promotes the transfer into cells is a cationic liposome, a membrane-fused liposome or a cationic polymer;

(19) The preparation according to (1) wherein the collagen is a type 1 collagen derived from dermis, or a type 1 collagen prepared by genetic engineering;

(20) The preparation according to (1) further comprising a pharmaceutically acceptable additive;

(21) The preparation according to (1) wherein the additive is a mono-, di-, tri-saccharide or a higher oligosaccharide or a corresponding sugar alcohol, a non-hydrophobic amino acid, or an organic acid having two or more carboxyl groups;

(22) The preparation according to (1) wherein the preparation is in the form of solution, suspension, sponge, pellet or powder;

(23) The preparation according to (22) wherein the preparation is a solution or a suspension having a pH of 4



to 8;

(24) The preparation according to (22) wherein the collagen content is in a range from 0.001 % to 10 % (w/w); and

(25) The preparation according to (22) wherein the preparation is in the form of sponge, pellet or powder, and has a collagen content of 5 to 99 % (w/w).

[0013]

Further, the present invention relates to antisense therapy for treating a cancer, which comprises administering the preparation for transferring an oligonucleotide according to the present invention. More particularly, it relates to antisense therapy which comprises administering the preparation comprising a desired oligonucleotide and a collagen to a living body via transdermal, subcutaneous, intradermic, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, interstitial, intravascular, oral, rectal, or gastrointestinal route, whereby transferring efficiently said oligonucleotide into a cell.

[0014]

A preparation for transferring an oligonucleotide, more particularly, a solution or a suspension preparation as obtained by mixing an oligonucleotide solution with a collagen solution (as well as a pharmaceutically acceptable additive) according to the

present invention, is characterized by the following properties:

- 1) it can be formed into a film, a sponge, a powder, a Minipellet or the like, depending on the particular object;
- 2) after administered in the target tissue or its around, the preparation will remain at the site where administered;
- 3) it protects oligonucleotide from being degraded by a nuclease;
- 4) it gradually release oligonucleotide;
- 5) The release rate of an oligonucleotide from the preparation can be controlled depending on the particular object;
- 6) The concentration of an oligonucleotide around a target tissue can be maintained at a high level;
- 7) it efficiently inhibits the expression of the target mRNA *in vivo* without inducing any side-effect and retains the inhibition for a long period of time.

Moreover, the present invention relates to a method for treatment and prevention of infectious diseases comprising using the preparation as described above; or a method for treatment and prevention of various diseases induced by over-expression of the certain gene information; and particularly to a method for treatment and prevention of a cancer.

The preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention may be a solution or a suspension obtained by mixing an oligonucleotide solution with a collagen solution, or may be a film, a sponge, a powder, or a Minipellet formed from the solution or the suspension. Therefore, a collagen used in the present invention may be desirably soluble in an acidic or neutral water. Preferably, these collagens can penetrate through a membrane filter having a pore size of 1 micrometer. Solubility of collagen may vary depending on the crosslinking degree of the collagen. Higher is the crosslinking degree, more difficult the collagen is solubilized. Accordingly, the crosslinking degree of a collagen used in the present invention is, for example, not more than 3 (trimer), more preferably not more than 2 (dimer). Preferable molecular weight of the collagen is, for example, from about 300,000 to 900,000, and more preferably from about 300,000 to about 600,000. Specifically, for example, such collagens include a type 1 collagen obtained by acid extraction from a mammal dermis. More preferably, they include, for example, a type 1 collagen obtained by acid extraction from calf dermis, a type 1 collagen produced by genetic engineering, and the like. Collagens derived from tendon, which are also type 1 collagens, are not suitable herein, because they have a

high degree of crosslinking and are insoluble. Further, an atelocollagen that is obtained by removing enzymatically a telopeptide having high antigenicity or an atelocollagen produced by genetic engineering is preferable for the sake of safety. An atelocollagen having three or less tyrosine residues per molecule is more preferable.

[0016]

An oligonucleotide used in the present invention is, for example, 5 mer to 30 mer in length, and more specifically 15 mer to 25 mer in length.

An oligonucleotide used in the present invention includes, for example, a DNA, a DNA derivative, an RNA, an RNA derivative and the like. More specifically, a DNA derivative or an RNA derivative is such as an oligonucleotide having at least one or more phosphorothioate bonds.

[0017]

More specifically, an oligonucleotide used in the present invention, at least a portion of which may contain a base sequence that binds complementarily under physiological condition to a sense or antisense strand of a gene encoding a protein that has a physiological effect to disrupt the homeostasis of living bodies, a gene specific to pathogenic viruses, bacteria or the like, and, more specifically, it contains a sequence that binds complementarily to the messenger RNA of a gene specific to

a pathogenic virus, a bacterium or the like, or a gene encoding a protein having a physiological effect to disrupt the homeostasis of a living body.

[0018]

More specifically, an oligonucleotide used in the present invention may contain a sequence complementary to a region containing an initiation codon of a messenger RNA, or to a splicing site of a precursor messenger RNA. Examples of the oligonucleotides used in the present invention include, for example, those used for treatment or prevention of a cancer, such as an oligonucleotide having a sequence of 5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3' which specifically inhibits the expression of hst-1; ISIS3521 which specifically inhibits the expression of protein kinase C $\alpha$  to effectively treat progressive cancers such as non-small cell lung carcinoma and colon cancer, and has been applied in the trials to the treatment of prostate cancer, breast cancer, ovary cancer, pancreas cancer, large intestinal cancer, small cell lung carcinoma; ISIS5132/CGP69846A which specifically inhibits the expression of C-raf kinase and has been applied in the trials to the treatment of prostate cancer, breast cancer, ovary cancer, cephalophyma, pancreas cancer, large intestinal cancer, small cell lung carcinoma; ISIS 2503 which specifically inhibits the expression of Ha-ras and has been applied in the trials to the treatment of

large intestinal cancer, breast cancer, cephalophyma, pancreas cancer, and small cell lung cancer; GEM231 which specifically inhibits the expression of protein kinase A type I; MG98 which specifically inhibits the expression of DNA methyl transferase; INXC-6295 which inhibits the expression of c-myc; INX-3001 which inhibits the expression of c-myb and has been considered to be applied to the treatment of leukemia; G-3139 (Genasense) which inhibits expression of bcl-2 and has been considered to be applied to the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, large intestinal cancer, small cell lung carcinoma, prostate cancer; an oligonucleotide which inhibits the expression of MDM2 protein; an oligonucleotide which inhibits the expression of VEGF and the like. Further, examples of the oligonucleotides used for treatment or prevention of infectious diseases include GEM92 and GPI-2A which inhibits the growth of HIV. ISIS2922 (fomivirsen), Vitravene, ISIS13312 and GEM132 which inhibit the growth of cytomegalovirus, ISIS14803 which inhibits the growth of hepatitis C virus, and the like. Examples of the oligonucleotides used for treatment of inflammation include ISIS2302 which specifically inhibits the expression of ICAM-1, and which has been applied in the trials to the treatment of Crohn's disease, ulcerative colitis, kidney transplantation rejection inhibition, psoriasis, asthma;

and oligonucleotides which inhibit the expression of TNF-  $\alpha$ , CD49d (VLA-4), VCAM-1, PECAM-1 and the like. Further, examples of the oligonucleotides that prevent the restenosis after percutaneous transluminal coronary angiogenesis include Resten-NG that inhibits the expression of c-myc.

[0019]

Genes encoding a protein that exhibits a physiological effect to disrupt the homeostasis include, for example, a series of genes, so-called cancer genes, and more specifically include genes for growth factors, receptor type tyrosine kinases, non-receptor type tyrosine kinases, GTP-binding proteins, serine-threonine kinases, transcription factors and the like. More specifically, genes coding for hst-1 or ornithine decarboxylase and the like are exemplified.

[0020]

As used herein, the oligonucleotide may be generally contained in a material that promotes the transfer of oligonucleotide into cells or a material that promotes the transportation of oligonucleotide into nucleus, or may form a complex together with said materials. Examples of the former include a cationic lipid, a cationic polymer, a hydrophobic polymer and the like. "Cationic lipids" include DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N-

trimethylammonium chloride), DOSPA (2,3-dioleyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate), DDAB (dimethyldioctacresyl-ammonium bromide), TM-TPS (N,NI,NII,NIII-tetramethyl-N,N',N'',N'''-tetrapalmitylspermine), DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammonium bromide), N-( $\alpha$ -trimethyl ammonium acetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride) (Biochemical Biophysical Research Communication, 196, 1042 (1994)) and the like. Cationic liposomes consisting of the cationic lipids as described above and neutral lipids such as DOPE (dioleoylphosphatidyl ethanol amine), or a mixture of cationic lipids and cholesterol may be used. "Cationic polymers" are polymers having electrostatic interaction with an oligonucleotides, and include, for example, lipopolyamines such as DOGS (dioctadecylamide glycylspermine) or the like; peptides such as AlkCWK18 or the like; cationic polyamino acids and their derivatives such as polylysine and their derivatives (Proceedings of Academy Sciences of the USA, 89, 6094 (1992)), polyethyleneimine, polyamine-den-drimer and the like. "Hydrophobic polymers" are polymers which interact hydrophobically with genes, and include, for example, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone and the like. In addition, peptides such as AlkCWK18 may be employed.

Examples of the cationic liposomes include, but



not limited to, LIPOFECTAMINE (trade name, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) containing DOSPA and DOPE (1:1), those containing DOTMA and DOPE (1:1), LIPOFECTACE (trade name, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) containing DDAB and DOPE (1:2.5), CELLFECTIN (trade name, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) containing TM-TPS and DOPE (1:1.5), and the like. Further, a mixture of said cationic lipid and cholesterol includes, for example, DMRIE-C (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) containing DMRIE and cholesterol (1:1 by mole).

Oligonucleotides may be contained in a membrane-fused liposome, or may be complexed with a liposome. Such membrane-fused liposomes includes, for example, HVJ-liposome.

Materials which promote transportation of a gene into nucleus include a mixture of HMG-1 and 2 (high mobility group-1, 2 mixture: Experimental Medicine, 12, 184 (1994)) and the like.

[0021]

The ratio of collagen to oligonucleotide in the preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention is important in that collagens attain: 1) protection of the oligonucleotide from a nuclease or other proteins, 2) sustained-release of the oligonucleotide, 3) local retention of the oligonucleotide to maintain locally

a high concentration of the oligonucleotide, 4) promotion to transfer the oligonucleotide into cells. The ratio of collagen to oligonucleotide may be expressed as the number of negative charges of the oligonucleotide in one molecule of collagen, as the chain length of the oligonucleotide may be appropriately selected depending on the particular object. Preferred number of negative charges of the oligonucleotide in a molecule of collagen in the preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention is 10 - 5,000, preferably 10 - 2,500, and more preferably 10 - 1000.

[0022]

The preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention may further comprise a pharmaceutically acceptable additive in addition to the oligonucleotide and the collagen.

For example, such additives include salts, amino acids and amines, which are used to adjust pH of the solution or the suspension type of the preparation for transferring an oligonucleotide; or those that control the release of oligonucleotide from a preparation for transferring an oligonucleotide in a form of a highly viscous solution or suspension, or a sponge, film, cylindrical and powdery. Examples of salts, amino acids and amines include tris(hydroxymethyl)aminomethane, sodium

citrate, sodium dihydrogen citrate, trisodium phosphate, sodium hydrogen phosphate, anhydrous monosodium phosphate, anhydrous sodium dihydrogen phosphate and the like.

Additives that control the release include, for example, monosaccharide, disaccharide, trisaccharide or higher oligosaccharides or sugar alcohols or derivatives thereof; amino acids, organic acids having two or more carboxyl groups; gelatin, albumin, fibrin, alginic acid, agarose, gum arabic, and the like.

Monosaccharides include, for example, glucose, galactose, fructose and the like, and preferably glucose. Disaccharides include, for example, sucrose, maltose, lactose, trehalose and the like.

Sugar alcohols include, for example, sorbitol, mannitol, and preferably mannitol.

Sugar derivatives include, for example, deoxy sugar, amino sugar, phosphate esters and disaccharides consisting of them.

[0023]

Amino acids include, for example, pharmaceutically acceptable amino acids, salts and derivatives thereof. Examples of amino acids include acidic amino acids such as glutamic acid, aspartic acid; basic amino acids such as lysine, arginine, histidine; glycine, alanine, methionine, proline, cystine, serine,

threonine, asparagine, glutamine, isoleucine, cysteine, tyrosine, tryptophane, leucine and the like. Amino acids as used herein further include amino acids that contains a basic or neutral side chain. Salts of amino acids include, for example, sodium salt, potassium salt.

Organic acids having two or more carboxy groups and salts thereof preferably include, for example, organic acids with two or three carboxy groups and salts thereof, and more preferably organic acids of saturated or unsaturated fatty series. Organic acids with two or three carboxy groups and salts thereof include, for example, citric acid, tartaric acid, succinic acid, malic acid, fumaric acid, and salts thereof. For example, citric acid, tartaric acid and salts thereof are preferred. Alternatively, an inactivated adenovirus having an ability to release the content of endosome, CHEMS (cholesterol hemisuccinate morpholine salt) or the like may be used in order to inhibit decomposition of oligonucleotide at endosome in cells.

[0024]

The preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention may include those containing any one of the sugars, the amino acids and the organic acids with two or more carboxyl groups as described above; and those containing two or three of any combination

thereof.

Control of release using additives may be adjusted by changing the content of the additives. For example, the content of the additives should be decreased to extend the release period, whereas the content of the additives should be increased to shorten the period. The amount of additives may be selected from 0 - about 19,800 w/w% based on collagen. Preferred range is about 1 - about 1,890 w/w%, more preferably, about 20 - about 900 w/w%, and more preferably about 80 - 300 w/w%.

[0025]

The preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention may be in a form of solution or suspension, or in a form of a sponge, cylinder or powder formed from the solution or the suspension. The preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention in a form of solution or suspension has a pH range from 4 to 8, and contains a collagen in the amount of 0.001 % to 10 %(w/w), preferably 0.1% to 5%(w/w). The preparation in a form of sponge, pellet or powder contains a collagen in the amount of 5 - 99 % (w/w), preferably 10 - 70 %( w/w), and more preferably 25 - 50 %(w/w).

The preparations of the present invention may be administered, for example, transdermally, subcutaneously,

intradermally, intramuscularly, intracerebrally, interstitially, intravascularly. They may be administered once every 3 days to once about every two months, preferably once a week to once a month.

[0026]

The dose of the present preparation may be easily adjusted by changing the liquid volume in case of the preparations in a form of solution or suspension; the size in case of the preparations in a form of sponge; the diameter and length in case of the cylindrical preparations; and the volume or weight in case of the preparations in a powder form. Further, the dose may be also adjusted by changing the amount of oligonucleotides contained in the preparations.

Optimal dose of the preparations of the present invention may vary depending on the disease; site of application, method of administration, dosage form, sex, age, condition of the patient and the like. The amount of oligonucleotide contained in the preparation is 0.001 mg/kg to 40 mg/kg, preferably 0.01 mg/kg to 30 mg/kg of the subject.

[0027]

The processes for preparing preparations for transferring an oligonucleotide of the present invention in a solution or suspension form may be prepared, for example:

- 1) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, and an additive is dissolved as needed in the mixture to obtain a preparation in a homogeneous solution or a suspension form;
- 2) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, and the mixture is mixed to obtain a preparation in a homogeneous solution or a suspension form;
- 3) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, and the mixture is mixed to obtain a preparation in a homogeneous solution or a suspension form;
- 4) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, and the resulting dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution to obtain a preparation in a homogeneous solution or a suspension form;
- 5) a process wherein a collagen solution is dried and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, to obtain a preparation in a homogeneous solution or a suspension form;
- 6) a process wherein a desired oligonucleotide solution is dried and the dried product is dissolved in a collagen solution added with an additive as needed, to obtain a preparation in a homogeneous solution or a suspension form;

and

7) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is dried, and the resulting dried product is dissolved in a collagen solution to obtain a preparation in a homogeneous solution or a suspension form. In the above methods, the suspension or the solution may be obtained controlling on the concentration of the oligonucleotide solution or a collagen solution.

[0028]

The processes for preparing the preparation for transferring an oligonucleotide in a film form include, for example:

1) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, and an additive is dissolved as needed in the mixture to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then slowly dried to obtain a preparation in a film form;

2) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, and the mixture is mixed to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then slowly dried to obtain a preparation in a film form;

3) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen



solution, and the mixture is mixed to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then slowly dried to obtain a preparation in a film form;

4) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then slowly dried to obtain a preparation in a film form;

5) a process wherein a collagen solution is dried, and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then slowly dried to obtain a preparation in a film form;

6) a process wherein a desired oligonucleotide solution is dried, and the dried product is dissolved in a collagen solution added with an additive as needed, to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then slowly dried to obtain a preparation in a film form;

7) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is dried, and the dried product is dissolved in a collagen solution to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then slowly dried to obtain a preparation in a film form.

[0029]

The processes for preparing a preparation for

transferring an oligonucleotide in a sponge form include, for example:

- 1) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, and an additive is dissolved as needed in the mixture to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried to obtain a preparation in a sponge form;
- 2) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, and the mixture is mixed to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried to obtain a preparation in a sponge form;
- 3) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, and the mixture is mixed to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried to obtain a preparation in a sponge form;
- 4) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution, to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried to obtain a preparation in a sponge form;
- 5) a process wherein a collagen solution is dried, and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, to obtain a

homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried to obtain a preparation in a sponge form.

[0030]

The processes for preparing a preparation for transferring an oligonucleotide in a powder form include, for example:

- 1) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, and an additive is dissolved as needed in the mixture to obtain a homogeneous solution, which is then spray-dried to obtain a preparation in a powder form;
- 2) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, and the mixture is mixed to obtain a homogeneous solution, which is then spray-dried to obtain a preparation in a powder form;
- 3) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, and the mixture is mixed to obtain a homogeneous solution, which is then spray-dried to obtain a preparation in a powder form;
- 4) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution to obtain a homogeneous solution, which is then spray-dried to obtain a

preparation in a powder form;

5) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed to obtain a homogeneous solution, which is then spray-dried to obtain a preparation in a powder form;

6) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, and an additive is dissolved as needed in the mixture to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried, and the resulting sponge is ground to obtain a preparation in a powder form;

7) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, and the combination is mixed to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried, and the resulting sponge is ground to obtain a preparation in a powder form;

8) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, and the mixture is mixed to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried, and the resulting sponge is ground to obtain a preparation in a powder form;

9) a process wherein a collagen solution added with an

additive as needed is dried, and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried, and the resulting sponge is ground to obtain a preparation in a powder form;

10) a process wherein a collagen solution is dried, and the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, to obtain a homogeneous solution or a suspension, which is then freeze-dried, and the resulting sponge is ground to obtain a preparation in a powder form;

11) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, into which is added an additive as needed, the resulting suspension is filtered, and the resulting precipitate is directly used or ground to obtain a preparation in a powder form;

12) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, the resulting suspension is filtered, and the resulting precipitate is used directly or ground to obtain a preparation in a powder form;

13) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, the resulting suspension is filtered and the resulting precipitate is used directly or ground to obtain

a preparation in a powder form;

14) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, the resulting dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution, the resulting suspension is filtered and the resulting precipitate is used directly or ground to obtain a preparation in a powder form;

15) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, the resulting suspension is filtered and the resulting precipitate is used directly or ground to obtain a preparation in a powder form;

16) a process wherein a desired oligonucleotide solution is dried, the dried product is dissolved in a collagen solution added with an additive as needed, the resulting suspension is filtered and the resulting precipitate is used directly or ground to obtain a preparation in a powder form;

17) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is dried, the dried product is dissolved in a collagen solution, the resulting suspension is filtered and the resulting precipitate is used directly or ground to obtain a preparation in a powder form.

[0031]

The processes for preparing a preparation for transferring an oligonucleotide in a cylindrical form include, for example:

- 1) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, into which is dissolved an additive as needed, the resulting homogeneous solution is spray-dried, and the resulting powder is compressed into cylinders;
- 2) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, the resulting homogeneous solution is spray-dried, and the resulting powder is compressed into cylinders;
- 3) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, the resulting homogeneous solution is spray-dried, and the resulting powder is compressed into cylinders;
- 4) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution, the resulting homogeneous solution is spray-dried, and the resulting powder is compressed into cylinders;
- 5) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, the resulting

homogeneous solution is spray-dried, and the resulting powder is compressed into cylinders;

6) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, into which is dissolved an additive as needed; the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried, the resulting sponge is ground to give powder which is compressed into cylinders;

7) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried, and the resulting sponge is ground to give powder which is compressed into cylinders;

8) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried, and the resulting sponge is ground to give powder which is compressed into cylinders;

9) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried, and thus obtained sponge is ground to give powder, which is compressed into cylinders;

10) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide



solution added with an additive as needed, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried, and thus obtained sponge is ground to give powder, which is compressed into cylinders;

11) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, into which is dissolved an additive as needed, the resulting suspension is filtered, and thus obtained precipitate is, directly or after ground into powder, compressed into cylinders;

12) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, the resulting suspension is filtered, and thus obtained precipitate is directly or after ground into powder, compressed into cylinders;

13) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, the resulting suspension is filtered, and thus obtained precipitate is, directly or after ground into powder, compressed into cylinders;

14) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, the resulting dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution, the resulting suspension is filtered, and thus obtained precipitate is, directly or after they are ground into powder, compressed into cylinders;

15) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, the resulting suspension is filtered, and thus obtained precipitate is, directly or after ground into powder, compressed into cylinders;

16) a process wherein a desired oligonucleotide solution is dried, the dried product is dissolved in a collagen solution added with an additive as needed, the resulting suspension is filtered, and thus obtained precipitate is, directly or after ground into powder, compressed into cylinders;

17) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is dried, the dried product is dissolved in a collagen solution, the resulting suspension is filtered, and thus obtained precipitate is, directly or after ground into powder, compressed into cylinders;

18) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, into which is dissolved an additive as needed, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is compressed into cylinders;

19) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as

needed, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is compressed into cylinders;

20) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with additive as needed is added to a collagen solution, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is compressed into cylinders;

21) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is compressed into cylinders;

22) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with additives, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is compressed into cylinders;

23) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, into which is dissolved an additive as needed, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

24) a process wherein a desired oligonucleotide solution is

added to a collagen solution added with an additive as needed, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

25) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

26) a process wherein the collagen solution added with an additive as needed is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

27) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is dissolved in a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, the resulting homogeneous solution or suspension is freeze-dried to give sponge, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

28) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution, into which is dissolved an

additive as needed, the resulting homogeneous solution is spray-dried to give powder, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

29) a process wherein a desired oligonucleotide solution is added to a collagen solution added with an additive as needed, the resulting homogeneous solution is spray-dried to give powder, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

30) a process wherein a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed is added to a collagen solution, the resulting homogeneous solution is spray-dried to give powder, which is, after addition of water or the like, kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

31) a process wherein a collagen solution added with an additive as needed is dried, a desired oligonucleotide solution is added to the dried product, then kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried;

32) a process wherein a collagen solution is dried, the dried product is added to a desired oligonucleotide solution added with an additive as needed, then kneaded, extruded into cylinder through a nozzle and dried.

[0032]

## Examples

The present invention is further illustrated by the following Examples and Experiments, but is not restricted by these Examples and Experiments in any way.

### Example 1

The preparation in a solution form for transferring an oligonucleotide which comprises atelocollagen at the final concentration of 0.5 %, was prepared by mixing the phosphorothioate antisense oligonucleotide (5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3'; molecular weight, about 6,500) (manufactured by Sawaday) having a sequence complementary to a sequence from 4196 bp to 4216 bp of the fibroblast growth factor HST-1 (FGF4) gene (described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890-2984 (1987)) with a neutral solution of atelocollagen (atelocollagen implant manufactured by KOKEN CO., LTD.; 2% atelocollagen solution) to be the final concentration to 10  $\mu$ mol/L.

[0033]

### Example 2

The preparation in a solution form for transferring an oligonucleotide was prepared by mixing the phosphorothioate type antisense oligonucleotide (AS-ODC, 5'-TCATGATTTCCTTGATGTTCC-3') manufactured by ESPEC OLICO SERVICE CORP.) having a sequence complementary to a

sequence from 319 bp to 338 bp in the ornithine decarboxylase gene with a neutral solution of atelocollagen (atelocollagen implant manufactured by KOKEN CO., LTD.; 3.5 w/w% atelocollagen solution; the final concentration, 1.75 w/w%) to bring the final concentration of the oligonucleotide to 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{mol/L}$ .

[0034]

#### Example 3

The preparation for transferring an oligonucleotide which contains a liposome was prepared by mixing AS-ODC with 0.5  $\mu\text{L}$  of a neutral solution of atelocollagen (atelocollagen implant manufactured by KOKEN CO., LTD.; 3.5 w/w% atelocollagen solution; final concentration, 1.75 wt%) and 1.5  $\mu\text{L}$  of Transfast (Promega) to bring the final concentration of the oligonucleotide to 10  $\mu\text{mol/L}$ .

[0035]

#### Example 4

The preparation in a solution form for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 1 (3 mL) was poured into a dish made of polystyrene (diameter; 35mm), and the dish was stood still in a desiccator containing silica gel at 5 °C to be slowly dried while keeping it even, to give a preparation in a film form for transferring an oligonucleotide containing 32.5  $\mu\text{g}$  of the

oligonucleotide per 1 mg of the collagen.

[0036]

#### Example 5

The preparation in a solution form for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 1 (3 mL) was poured into a dish made of polystyrene (diameter; 35mm), and the dish was frozen at - 40 °C, then dried overnight under reduced pressure at room temperature, to give a preparation in a sponge form for transferring an oligonucleotide containing 32.5 µg of the oligonucleotide per 1 mg of the collagen.

[0037]

#### Example 6

After adding water (52.5 g) and a 10 mg/mL glucose solution (10 mL) to a 2 w/w% atelocollagen solution (17.5 g), the mixture was added with a 5 mg/mL solution (10 mL) of the phosphorothioate type antisense oligonucleotide (5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3'; molecular weight: about 6.500), and the mixture was mixed. The resulting solution was frozen at - 40 °C, and then dried overnight under reduced pressure at room temperature. A proper amount of distilled water was added to the freeze-dried product thus obtained and the mixture was kneaded. Then, the kneaded product was extruded through a nozzle into rods, and dried to give preparations in a rod form. This gave gene preparations in



rod forms containing 1 mg of the oligonucleotide per 10 mg of the preparation.

[0038]

Reference Example 1

A solution of the phosphorothioate type antisense oligonucleotide was prepared by the same manner of Example 1, except that the neutral solution of atelocollagen was replaced with distilled water.

[0039]

Reference Example 2

A preparation in a solution form was obtained by the same manner of Example 1, except that the phosphorothioate type antisense oligonucleotide having a sequence complementary to a sequence from 4196 b to 4216 b of the fibroblast growth factor HST-1 (FGF 4) gene (described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890 - 2984 (1987)) was replaced by the phosphorothioate type sense oligonucleotide (5'-ACAACTACAACGCCTACGAG-3') having the same sequence.

[0040]

Reference Example 3

The phosphorothioate type antisense oligonucleotide (5'-CTCGTAGGCGTTGTAGTTGT-3'); molecular weight about 6,500) having a sequence complementary to a sequence from 4196 b to 4216 b of the fibroblast growth

factor HST-1 (FGF 4) gene (described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2890 - 2984 (1987)) was dissolved in a phosphate buffer (500  $\mu$ L) to bring the concentration to 20  $\mu$ mol/L. The solution was mixed with a phosphate buffer (500  $\mu$ L) containing lipofectamine (GIBCO BRL) (25  $\mu$ /L) dissolved therein, and then the mixture was stood still to react at room temperature for 20 minutes to obtain a oligonucleotide-liposome preparation (final concentration of the oligonucleotide, 10  $\mu$ mol/L).

[0041]

#### Reference Example 4

According to the procedures described in Example 2, except that the phosphate buffer was added instead of AS-ODC, an atelocollagen solution containing 1.75 w/w% atelocollagen was prepared.

[0042]

#### Reference Example 5

According to the procedures described in Example 2, except that the neutral solution of atelocollagen was replaced by a phosphate buffer, a solution of the phosphorothioate type antisense oligonucleotide containing AS-ODC at the concentration of 10  $\mu$ mol/L was prepared.

[0043]

#### Reference Example 6

According to the procedures described in Example 2, except that the phosphorothioate type scramble oligonucleotide (5'-AGTACTAAAGAACTACAAGG-3') (ESPEC OLIGO SERVICE CORP.) containing a heterologous sequence was contained at the concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$ , instead of AS-ODC, a phosphorothioate type scramble oligonucleotide composition in a solution form was obtained.

[0044]

#### Reference Example 7

The liposome preparation was obtained by mixing a phosphate buffer and a phosphate buffer containing transfast (Promega) dissolved therein to bring the final AS-ODC concentration to 10  $\mu\text{mol/L}$ .

[0045]

#### Experiment 1

The preparation for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 1 (2  $\mu\text{L}$ ) was mixed with a PBS (-) solution (100  $\mu\text{L}$ ) containing 20 % fetal bovine serum, and the mixture was stood still at 37 °C. After mixing, the aliquots of the mixed solution were taken after 30, 60, 180 minutes, and subjected to 3% agarose gel electrophoresis, to evaluate the primary structure of the phosphorothioate type antisense oligonucleotide in the preparation. The results are shown in Figure 1. For the phosphorothioate type antisense oligonucleotide in the

oligonucleotide-type preparation as prepared in Example 1, a band was observed at the migrated position of untreated phosphorothioate type antisense oligonucleotide even 180 minutes after mixed with PBS (-) solution containing 20 % fetal bovine serum. On the other hand, the preparation of Reference Example 1 exhibited no band after 30 minutes. The results showed that the phosphorothioate type oligonucleotide in the preparation of the present invention was protected from degradation with an enzyme.

[0046]

#### Experiment 2

Human testicular embryonal carcinoma cells (NEC-8) ( $10 \times 10^5$ ) producing HST-1 were transplanted into the testes of the 10-weeks old male nude mice. Ten days after the transplantation, the preparation as prepared in Example 1 was administered at the dose of 50  $\mu$ l per testis. 10, 20, and 30 days after the administration, the nude mice were sacrificed, and the tumor cells in the testes were weighed. The results are shown in Figure 2. The growth of the testicular embryonal carcinoma cells in the testes of the nude mice was most strongly inhibited by the preparation of Example 1, compared to the gel composition of Reference Example 2 and the liposome composition of Reference Example 3 (each administered at 50  $\mu$ l/testis). Particularly, the liposome composition of Reference Example

3 showed an inhibition effect similar to that of the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 1 until 20 days, but did not show any growth inhibition effect after 30 days. This result shows that the preparation of the present invention retains in the testes of the nude mice after the administration, protects the phosphorothioate type oligonucleotide which inhibits HST-1 production in the nude mice from enzymatic degradation, and further has an activity to inhibit the growth of tumor cells effectively for a long period by locally and gradually releasing this phosphorothioate type oligonucleotide.

[0047]

#### Experiment 3

$5 \times 10^5$  of the human stomach cancer cells (MKN 45 cell) (Japan Health Sciences Foundation) cultured in DMEM (1 mL) containing 10 % fetal bovine serum were added with 0.5  $\mu$ L of the preparation in a solution form for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 2 (containing 10  $\mu$ mol/L of AS-ODC), and cultured at 37 °C. Twenty four hours after the addition, the medium containing the preparation for transferring an oligonucleotide was replaced with a fresh medium, and then cultivation was conducted for 6 days while replacing medium every 24 hours. After the addition, the number of cells was measured every

2 days using MTT assay. Similarly, the atelocollagen solution as prepared in Reference Example 4, the phosphorothioate type antisense oligonucleotide solution as prepared in Reference Example 5, and the phosphorothioate type scramble composition for transferring an oligonucleotide in a solution form as prepared in Reference Example 6 were added to MKN 45 cells, and the number of cells was measured. The results are shown in Figure 3. When the preparation in a solution form of Example 2 was administered, the growth of MKN 45 cells was significantly inhibited compared to the control with nothing added. Further, MKN 45 cells were decreased in number after 6 days, compared to the number at the time of addition. On the other hand, when the preparations of Reference Example 4 (atelocollagen solution), Reference Example 5 (containing AS-ODC alone), and Reference Example 6 (containing the phosphorothioate type scramble oligonucleotide and atelocollagen) were added, the growth of MKN 45 cells was inhibited compared to control, but the effect was lower than that of Example 2. These results show that the growth inhibition effect of the phosphorothioate type antisense oligonucleotide on tumor cells may be enhanced by mixing said preparation with atelocollagen to prepare the preparation of the present invention, and that the mechanism to inhibit the growth of tumor cells by the

preparation of the present invention is derived not only from coexistence of atelocollagen or the phosphorothioate type oligonucleotide with the target cells, but from the growth inhibition and cytotoxicity of the target cell by the phosphorothioate type antisense oligonucleotide.

[0048]

#### Experiment 4

5  $\mu$ L each of the preparations in a solution form for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 2 (containing 5, 10, 15, 20, 25  $\mu$ mol/L of AS-ODC) was added to  $5 \times 10^5$  of human rhabdomyosarcoma cells (RD cells) (Japan Health Sciences Foundation) which had been cultured in 1 mL of DMEM containing 10% fetal bovine serum, and the cells were cultured at 37 °C. Twenty four hours after the addition, the media containing the preparations were replaced with a fresh medium, then cultivation was conducted for 5 days while replacing the media every 24 hours. One and 35 days after addition, survival rates of the cells were measured using trypan-blue staining. The results are shown in Figure 4. All of the preparations measured exhibited the decrease in survival ratio of RD cells. Even at the lowest concentration, i.e., 5  $\mu$ mol/L, the preparation exhibited the cytotoxicity effect.

[0049]

#### Experiment 5

The liposome-containing preparation for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 3 (0.5  $\mu$ L) was added to  $5 \times 10^5$  of human rhabdomyosarcoma cells (RD cells) which had been cultured in 1 mL of DMEM containing 10% fetal bovine serum, and the cells were cultured at 37 °C. Twenty four hours after the addition, the medium containing the preparation was replaced with a fresh medium, then cultivation was conducted for 8 days while replacing medium every 24 hours. 2, 4, 6 and 8 days after the addition, survival ratio of the cells was measured using trypan-blue staining. 2, 4 and 6 days after the addition, the ornithine decarboxylase activity in RD cells was also measured. Similarly, the liposome preparation of Reference Example 7 was added, and then the survival of RD cells and the ornithine decarboxylase activity in the cells were investigated. The results are shown in Figures 5 and 6. Both the liposome-containing preparation for transferring an oligonucleotide of Example 3 and the liposome preparation of Reference Example 7 decreased the survival of RD cells, although the preparation for transferring an oligonucleotide exhibited the stronger cytotoxicity. Similarly, both liposome-containing preparation for transferring an oligonucleotide and the liposome preparation decreased the ornithine decarboxylase activity in RD cells, with the degree of



decrease by the preparation for transferring an oligonucleotide being stronger than that by the liposome preparation. This is because the preparation for transferring an oligonucleotide containing liposome of Example 3 inhibited the expression of the target gene, ornithine decarboxylase gene, more strongly compared to the liposome preparation of Reference Example 7, and decreased the RD cell number. These results show that the preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention, even when containing a liposome, enhances cytotoxicity by the phosphorothioate type oligonucleotide, and is superior in such enhancement to the conventional liposome preparations.

[0050]

#### Experiment 6

5 x 10<sup>7</sup> RD cells over-expressing ornithine decarboxylase were transplanted subcutaneously on the back of the 4-week old male nude mice. Seven days after the transplantation, the preparation for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 2 (containing 10 $\mu$ mol/L of AS-ODC) was administered in the site of the transplantation, in the back muscle opposed to the transplantation, and in the peritoneal cavity. Similarly, the atelocollagen solution of Reference Example 4, the liposome preparation of Reference Example 7, and the

phosphate buffer were respectively administered to the site where the RD cells were transplanted. After the administration, the nude mice were sacrificed every 7 days, and the RD cells were weighed. The results are shown in Figures 7, 8 and 9. The growth of RD cells in the back muscle of the nude mice was most strongly inhibited by the preparation for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 2 in all nude mice when administered at the RD transplantation site, intramuscularly at the opposite side of the transplantation, and intraperitoneally (Fig. 9), compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4 (Fig. 7), the liposome preparation of Reference Example 7 (Fig. 8) and the phosphate buffer. Particularly, the liposome preparation of Reference Example 7 exhibited an inhibition corresponding to that of the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2 until 7 days, but exhibited no inhibition of the growth after 14 days. These facts show that the preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention inhibits the growth of RD cells more strongly compared to the liposome preparation, that such inhibition of growth of RD cells may last for a long time, and that such inhibition of growth may not be affected by the site of administration. This result suggests that the oligonucleotide preparation of the present invention has an efficient inhibition effect on the

growth of tumor cells, which lasts for a long time by protection of the phosphorothioate type antisense oligonucleotide from degradation by an enzyme in the nude mice after administration, and gradually releasing the phosphorothioate type oligonucleotide. Figures 10 and 11 show the cumulative survival curve of RD cell-transplanted nude mice. When the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2 was administered at the site of RD-transplantation, the average viable period of the mice was 52.6 days, which was greatly elongated compared to the nude mice administered with the phosphate buffer (average, 20.5 days), the atelocollagen solution of Reference Example 4 (average 40.3 days) (Fig. 10) and the liposome preparation of Reference Example 7 (average 37.8 days) (Fig. 11). This result shows that the inhibition of growth of RD cells which can be obtained by administration of the present preparation for transferring an oligonucleotide will enhance the survival of the nude mice that had been transplanted with RD cells. Further, ornithine decarboxylase activities in RD cells after 42 days of administration of the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, the atelocollagen solution of Reference Example 4, the liposome preparation of Reference Example 7 and the phosphate buffer are shown in Figures 12 and 13. Ornithine decarboxylase activity in RD

cells treated with the preparation for transferring an oligonucleotide is lower than those treated with the atelocollagen solution, the liposome preparation and the phosphate buffer. This suggests that ornithine decarboxylase production is inhibited by administration of the preparation for transferring an oligonucleotide, and the inhibition of growth of RD cells observed upon administration of the preparation for transferring an oligonucleotide is obtained by inhibiting the expression of ornithine decarboxylase gene by the phosphorothioate type oligonucleotide contained in the preparation for transferring an oligonucleotide.

[0051]

#### Experiment 7

$5 \times 10^7$  MKN 45 cells over-producing ornithine decarboxylase were transplanted subcutaneously to the back of 4-week old male nude mice. Seven days after transplantation, 50  $\mu$ L of the preparation for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 2 (containing 10 $\mu$ mol/L of AS-ODC) was administered at the site where MKN45 cells were transplanted. Similarly, the atelocollagen solution of Reference Example 4, the phosphorothioate type scramble oligonucleotide composition in a solution form of Reference Example 6 and the phosphate buffer were respectively administered at the site where MKN

45 cells had been transplanted. After administration, the nude mice were sacrificed every 7 days and MNK 45 cells were weighed. The result is shown in Figure 14. Growth of MKN 45 cells in the back muscle of the nude mice was most strongly inhibited by the preparation for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 2 compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4, the phosphorothioate scramble oligonucleotide composition in a solution form of Reference Example 6 and the phosphate buffer. This result suggests that the preparation for transferring an oligonucleotide of the present invention inhibits the growth of MKN 45 cells, and holds the effect to inhibit the growth of MKN 45 cells for a long time. Figure 15 shows a cumulative survival curve of the nude mice transplanted with MKN cells. Average viable period of the nude mice administered with the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2 at the site of the transplantation was 48.5 days, which was greatly elongated compared to those administered with the atelocollagen solution of Reference Example 4 (39.1 days), the phosphorothioate scramble oligonucleotide composition in a solution form of Reference Example 6 (39.1 days), and the phosphate buffer (21.3 days). The result suggests that the inhibition of growth of MKN cells obtained by administration of the present oligonucleotide preparation

will enhance the survival of the nude mice transplanted with MKN cells. Further, ornithine decarboxylase activities in MKN 45 cells on the 35<sup>th</sup> days after administration of the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, the atelocollagen solution of Reference Example 4, the phosphorothioate type scramble oligonucleotide composition in a solution form of Reference Example 6 and the phosphate buffer are shown in Figure 16. Ornithine decarboxylase activity in MKN 45 cells treated with the preparation for transferring an oligonucleotide was significantly lower than those treated with the atelocollagen solution, the phosphorothioate scramble oligonucleotide composition in a solution form and the phosphate buffer. This suggests that ornithine decarboxylase production is inhibited by administration of the preparation for transferring an oligonucleotide, and that such inhibition of the growth of MKN 45 cells observed upon administration of the preparation for transferring an oligonucleotide is caused by the inhibition of expression of the ornithine decarboxylase gene by phosphorothioate type oligonucleotide contained in the oligonucleotide-transferring preparation.

[0052]

#### Experiment 8

5 x 10<sup>7</sup> human large intestinal cancer cells

(COLO201 cells) (Japan Health Sciences Foundation) over-producing ornithine decarboxylase were transplanted subcutaneously to the 4-week old male nude mice. Seven days after the transplantation, 50 $\mu$ L of the preparation for transferring an oligonucleotide as prepared in Example 2 (containing 10 $\mu$ mol/L of AS-ODC) was administered at the site where COLO201 had been transplanted. Similarly, the atelocollagen solution as prepared in Reference Example 4 and the phosphate buffer were respectively administered to the site where COLO201 cells had been transplanted. After the administration, the nude mice were sacrificed every 7 days, and COLO201 cells were weighed. The results are shown in Figure 17. Growth of COLO201 cells in the back muscle of the nude mice was most strongly inhibited by the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4 and the phosphate buffer. The weight of COLO201 cells was also decreased compared to those at the time of transplantation. These results suggest that the present preparation for transferring an oligonucleotide inhibits the growth of COLO201 and kills COLO201 cells, and that such inhibition effect of growth of COLO201 cells may last for a long time. Figure 18 shows a cumulative curve of nude mice transplanted with COLO201 cells. Average viable period of the nude mice treated with the preparation for

transferring an oligonucleotide of Example 2 was 39.8 days, which was longer than those of the atelocollagen solution and the phosphate buffer (31.2 days and 20.6 days, respectively). This result suggests that such inhibition of growth of COLO201 obtained by administration of the present preparation for transferring an oligonucleotide enhanced the survival of the nude mice transplanted with COLO201. Further, Figure 19 shows the ornithine decarboxylase activity in COLO201 cells after 35 days of administration of the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, the atelocollagen solution of Reference Example 4 and the phosphate buffer. Ornithine decarboxylase activity in COLO 201 cells treated with the preparation for transferring an oligonucleotide was lower than those treated with the atelocollagen solution and the phosphate buffer. This result suggests that administration of the preparation for transferring an oligonucleotide inhibits the production of ornithine decarboxylase. The result suggests that inhibition of growth of COLO 201 cells observed upon administration of the preparation for transferring an oligonucleotide is caused by inhibition of expression of ornithine decarboxylase gene by the phosphorothioate type oligonucleotide contained in the oligonucleotide transferring preparation.



Effect of the invention:

The preparation comprising an oligonucleotide having a base sequence complementary to that of a target m-RNA, and a collagen (as well as a pharmaceutically acceptable additive) effectively inhibits the expression of the target m-RNA without inducing any side effect *in vivo*, and maintains the inhibition effect for a long period of time, whereby attaining gene therapy.

Brief explanation of the drawings:

Figure 1 shows a 3% agarose-gel electrophoresis in Experiment 1. Fig. 1 shows the effect of nuclease on phosphorothioate antisense oligonucleotide in oligonucleotide preparations of Example 1 and Reference Example 1. Lane 1: Example 1 - after 0 min., Lane 2: Example 1 - after 30 min., Lane 3: Example 1 - after 60 min., Lane 4: Example 1 - after 180 min., Lane 5: Reference Example 1 - after 0 min.

Figure 2 is a graph showing that administration of the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 1 to nude mouse testis, to which human testicular tumor cells (NEC-8) had been transplanted, inhibited the growth of NEC-8 cells for a long time.

Figure 3 is a graph showing the *in vitro* addition of the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2 to the human stomach cancer

cells inhibited the growth of human stomach cancer cells, and decreased the number of cells compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4, the antisense oligonucleotide solution of Reference Example 5, the scramble oligonucleotide composition of Reference Example 6.

Figure 4 is a graph showing the comparison of the *in vitro* inhibition of growth of human rhabdomyosarcoma cells between the concentrations of the phosphorothioate antisense oligonucleotide contained in the preparations for transferring an oligonucleotide of Example 2.

Figure 5 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide containing a liposome according to Example 3, when added to human rhabdomyosarcoma cells *in vitro*, exhibited the stronger cytotoxic effect, compared to the liposome preparation of Reference Example 7.

Figure 6 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide containing a liposome according to Example 3, when added to human rhabdomyosarcoma cells *in vitro*, reduced the activity of ornithine decarboxylase more strongly than the liposome preparation of Reference Example 7.

Figure 7 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example

2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human rhabdomyosarcoma cells at the site of transplantation, inhibited the growth of rhabdomyosarcoma cells for a longer period of time than the atelocollagen solution of Reference Example 4.

Figure 8 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human rhabdomyosarcoma cells at the site of transplantation, inhibited for a longer period of time than the liposome preparation of Reference Example 7.

Figure 9 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human rhabdomyosarcoma cells in the site of the transplantation, the back muscle opposed to the transplantation site and in peritoneal cavity, inhibited the growth of rhabdomyosarcoma cells at all of the sites for a longer period of time compared to the liposome preparations administered at rhabdomyosarcoma-transplanted site.

Figure 10 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human rhabdomyosarcoma cells at the site

of the transplantation, enhanced survival of the nude mice compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4.

Figure 11 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human rhabdomyosarcoma cells at the site of transplantation, enhanced survival of the nude mice compared to the liposome preparation of Reference Example 7.

Figure 12 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human rhabdomyosarcoma cells at the site of transplantation, inhibited the production of ornithine decarboxylase in the rhabdomyosarcoma cells more strongly compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4.

Figure 13 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human rhabdomyosarcoma cells at the site of transplantation, inhibited production of ornithine decarboxylase in the rhabdomyosarcoma cells more strongly compared to the liposome preparation of Reference Example 7.

Figure 14 is a graph showing that the

preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human stomach cancer cells at the site of transplantation, inhibited growth of the stomach cancer cells for a longer period of time compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4 and the solution composition of Reference Example 6 containing a phosphorothioate oligonucleotide having a sequence heterologous to that of the gene of ornithine decarboxylase.

Figure 15 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human stomach cancer cells at the site of transplantation, enhanced survival of the nude mice compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4 and the solution composition of Reference Example 6 containing a phosphorothioate oligonucleotide having a sequence heterologous to that of the gene of ornithine decarboxylase.

Figure 16 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human stomach cancer cells at the site of transplantation, inhibited the production of ornithine decarboxylase in the stomach cancer cells more strongly

compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4 and the solution composition of Reference Example 6 containing a phosphorothioate oligonucleotide having a sequence heterologous to that of the gene of ornithine decarboxylase.

Figure 17 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human large intestinal cancer cells at the site of transplantation, inhibited growth of the large intestinal cancer cells for a longer period of time compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4.

Figure 18 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human large intestinal cancer cells at the site of transplantation, enhanced survival of the nude mice compared to the atelocollagen solution of Reference Example 4.

Figure 19 is a graph showing that the preparation for transferring an oligonucleotide of Example 2, when administered to the nude mice that had been transplanted with human large intestinal cancer cells at the site of transplantation, inhibited the production of

ornithine decarboxylase in the large intestinal cancer cells more strongly than the atelocollagen solution of Reference Example 4.

Document name:

Drawings

Fig. 1

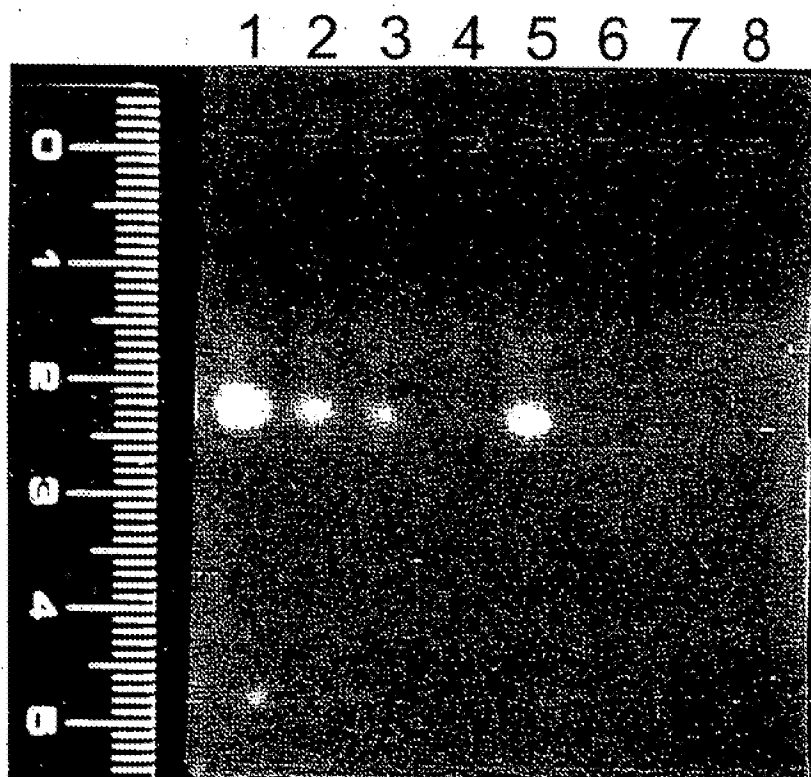




Fig. 2

Fig. 2

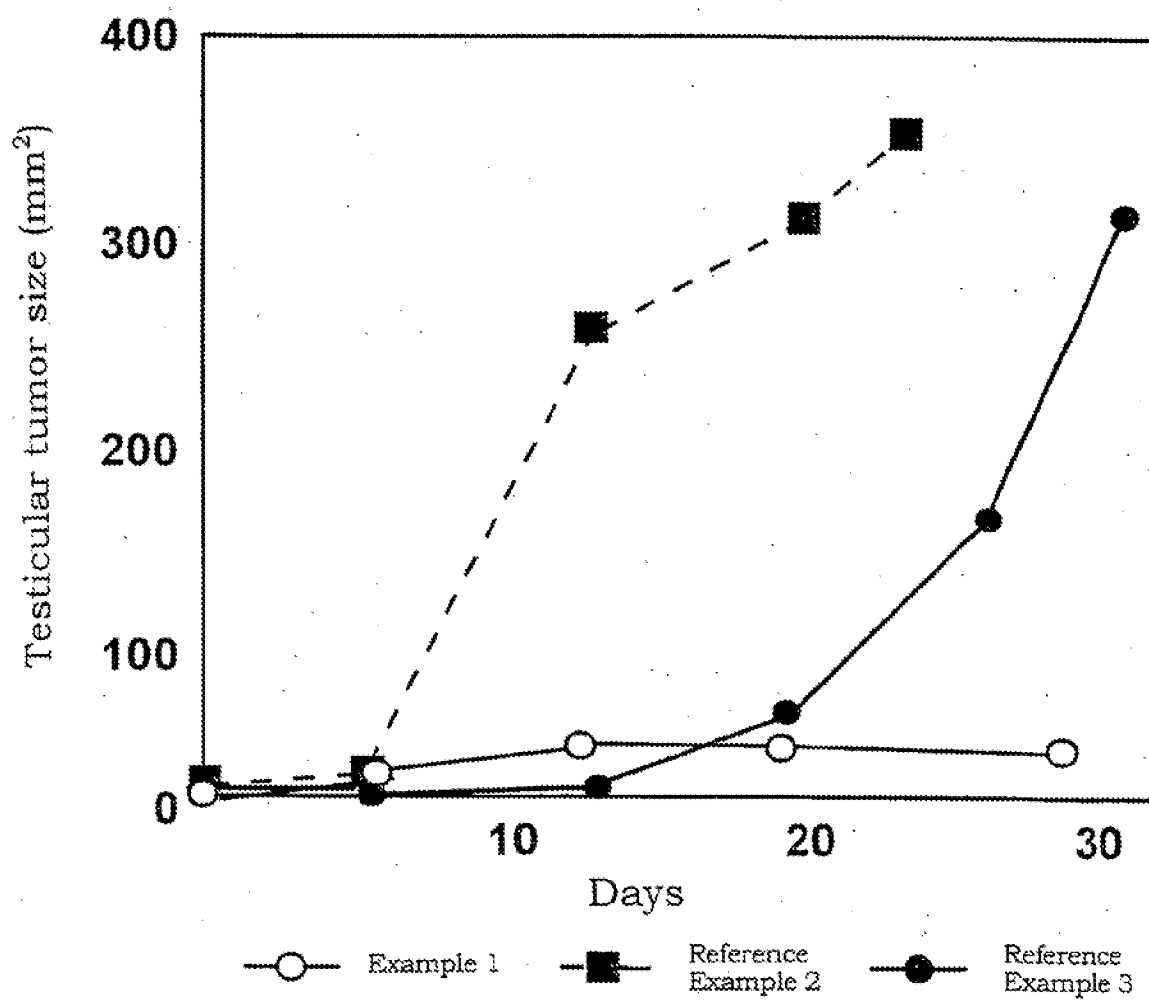


Fig. 3

Fig. 3

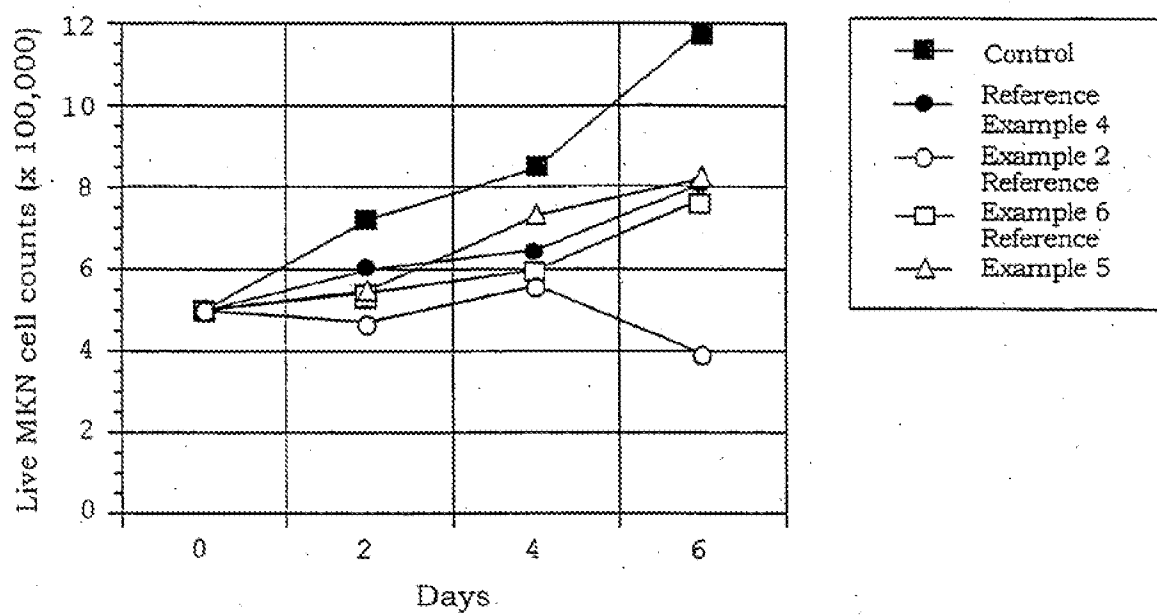


Fig. 4

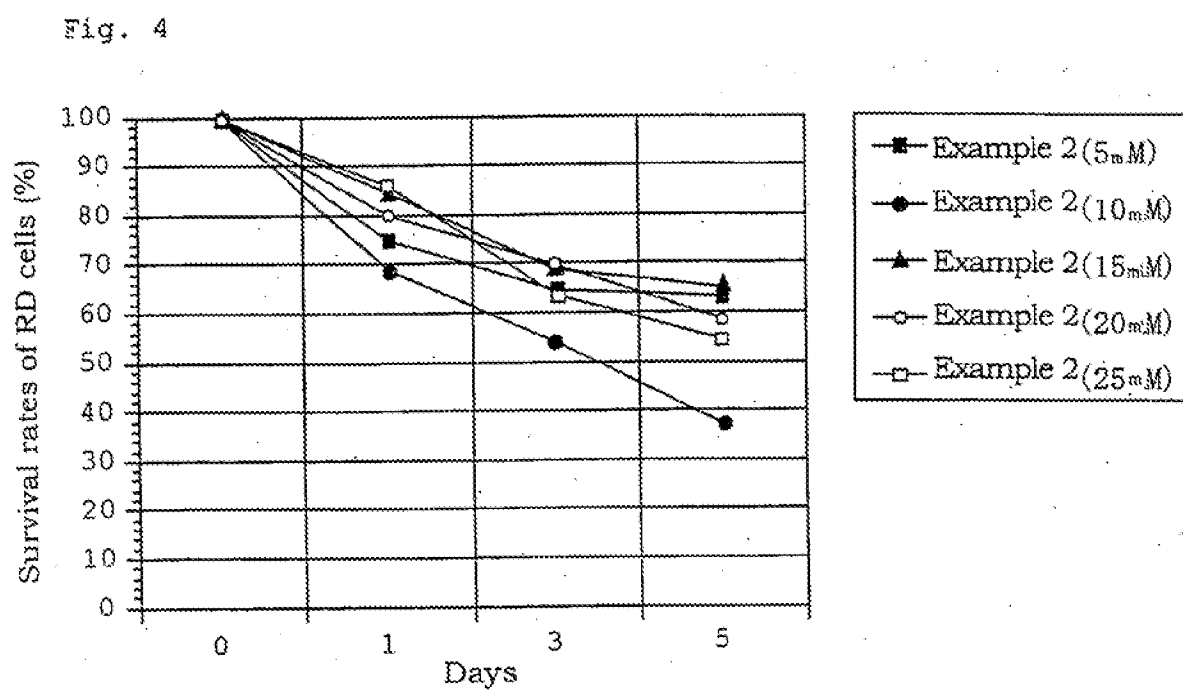


Fig. 5

Fig. 5

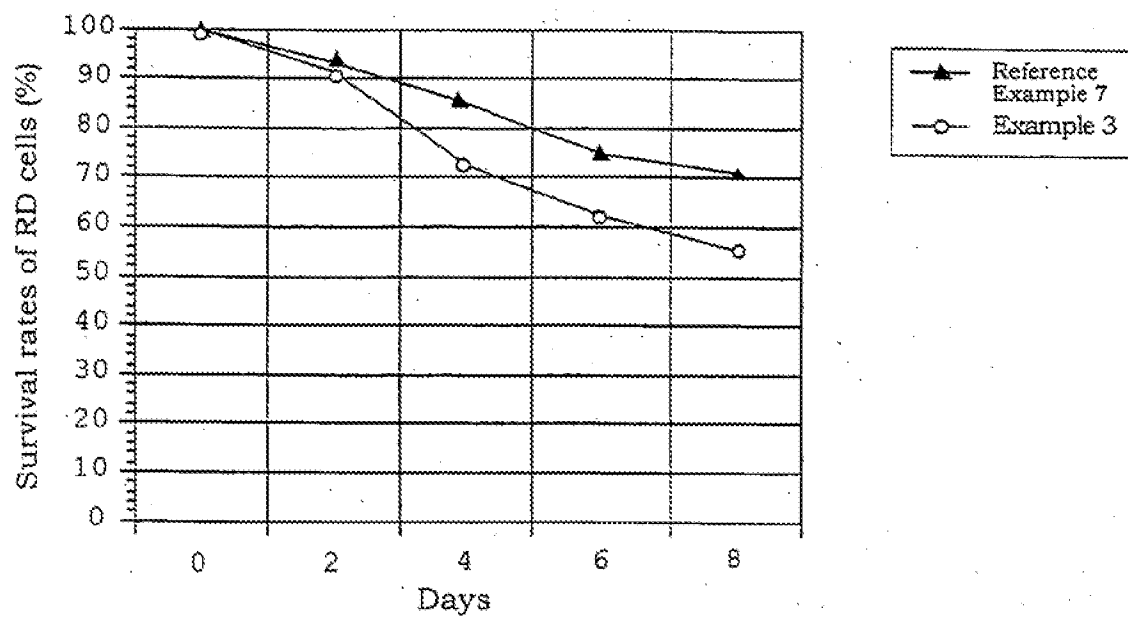


Fig. 6

Fig. 6

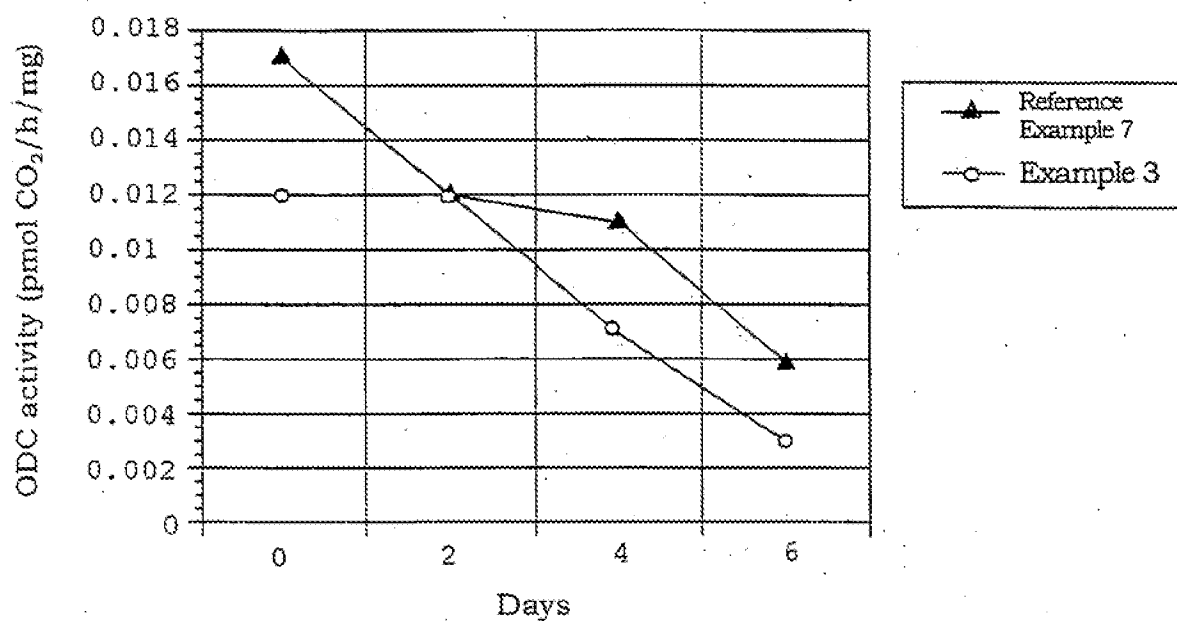


Fig. 7

Fig. 7

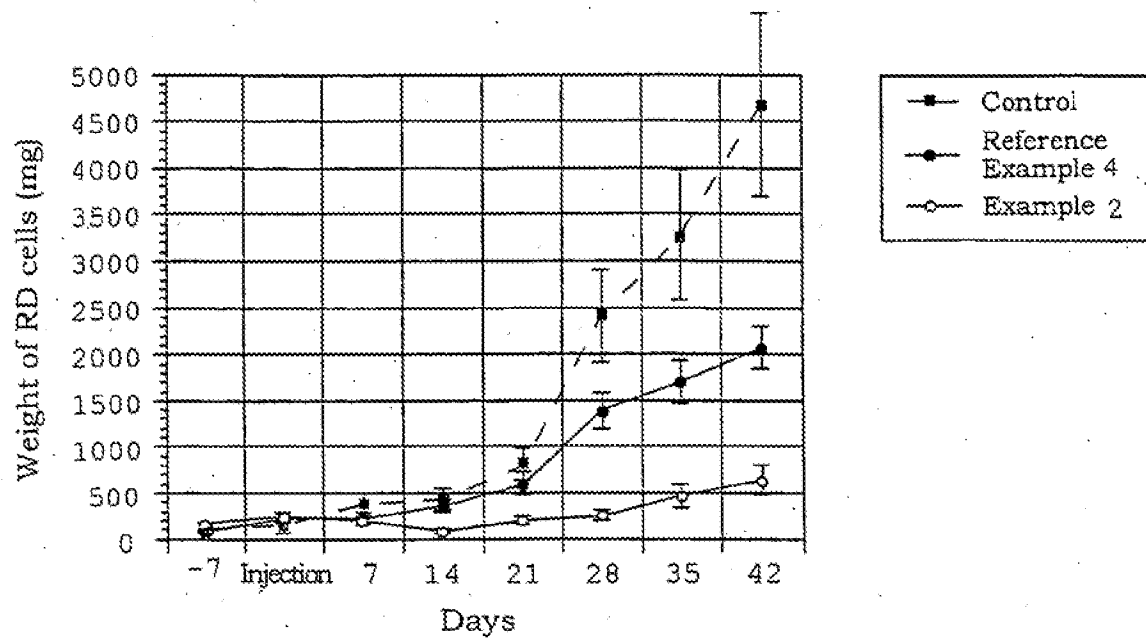


Fig. 8

Fig. 8

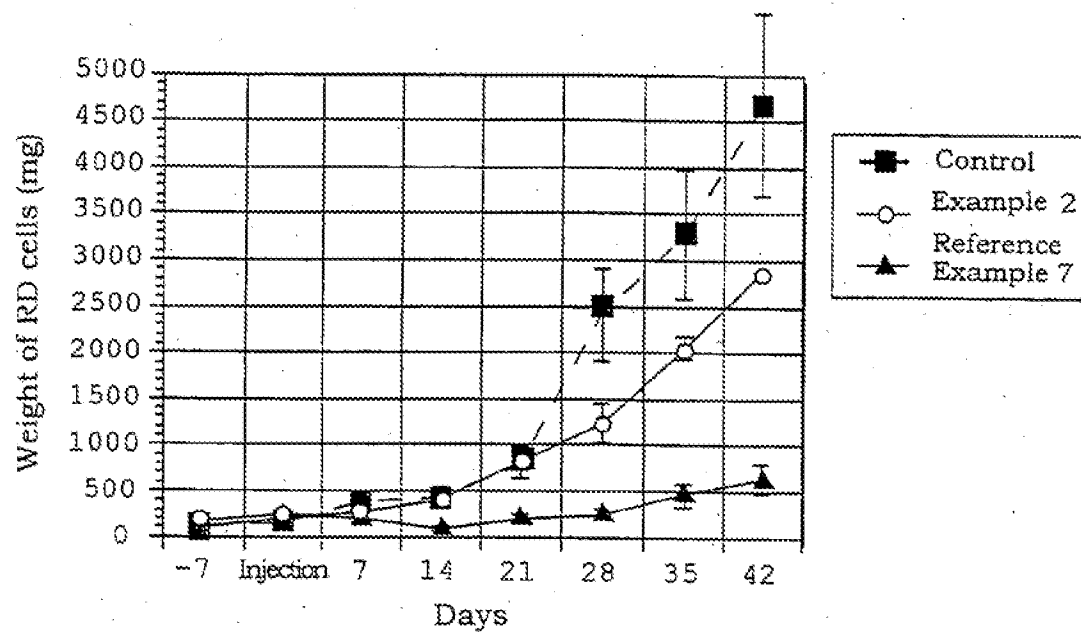


Fig. 9

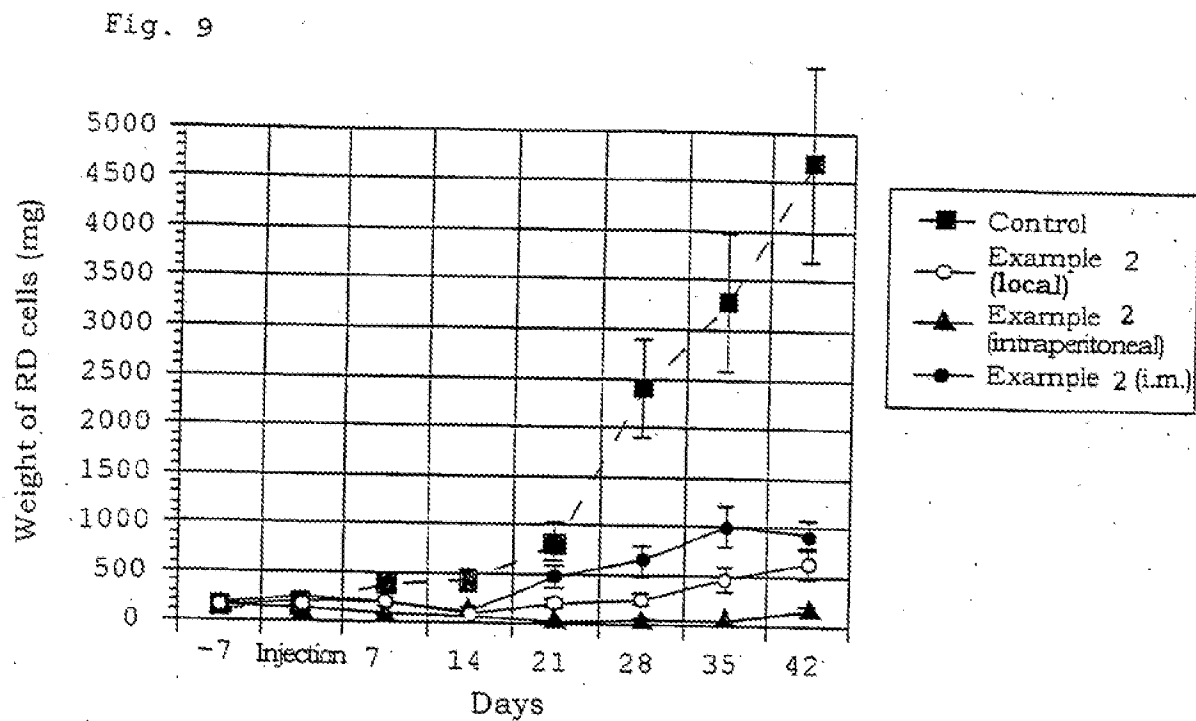




Fig. 10

Fig. 10

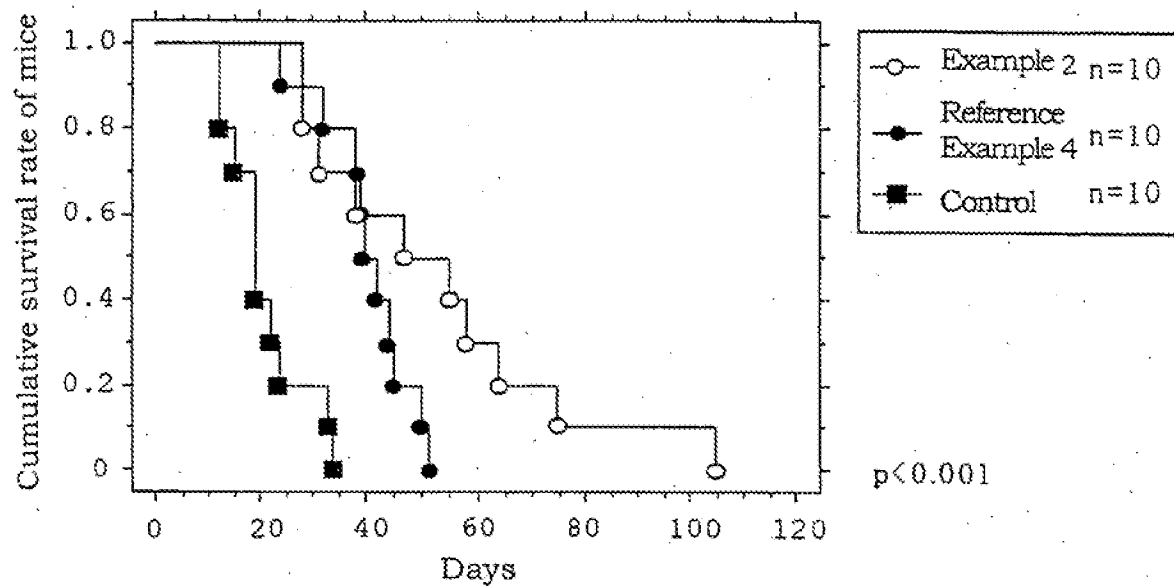


Fig. 11

Fig. 11

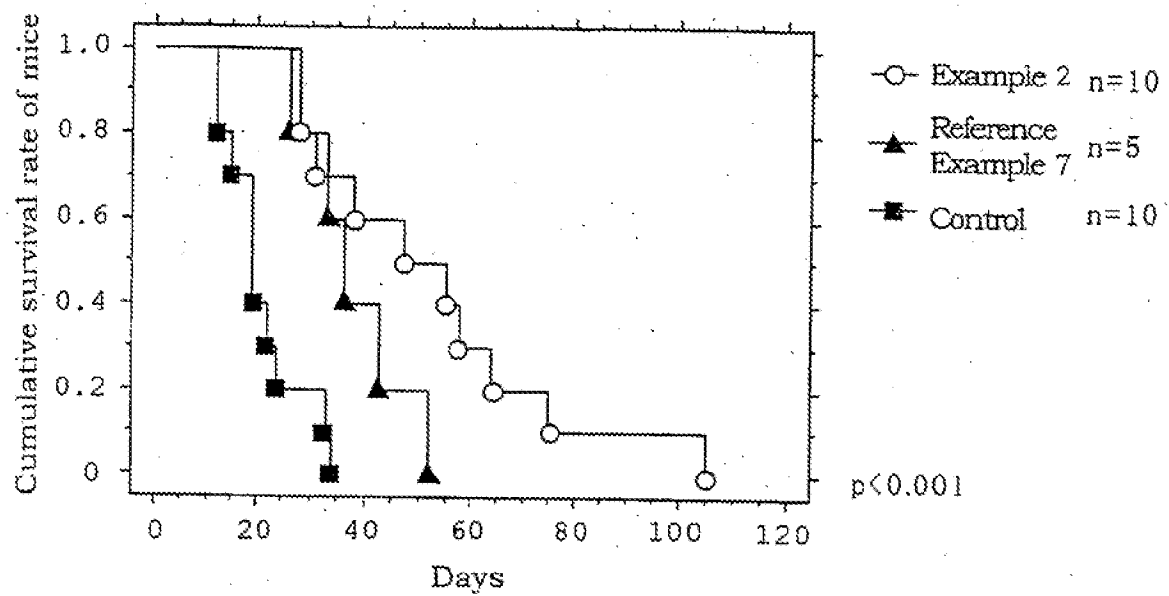


Fig. 12

Fig. 12

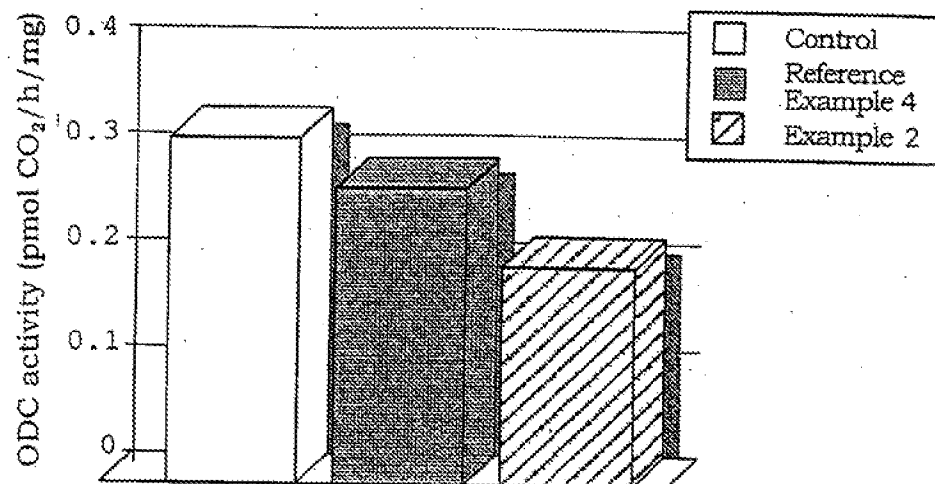


Fig. 13

Fig. 13

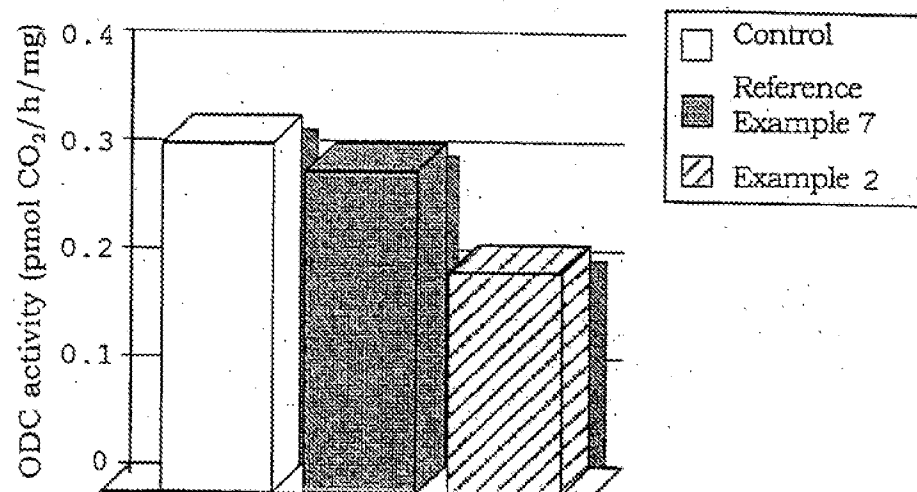


Fig. 14

Fig. 14

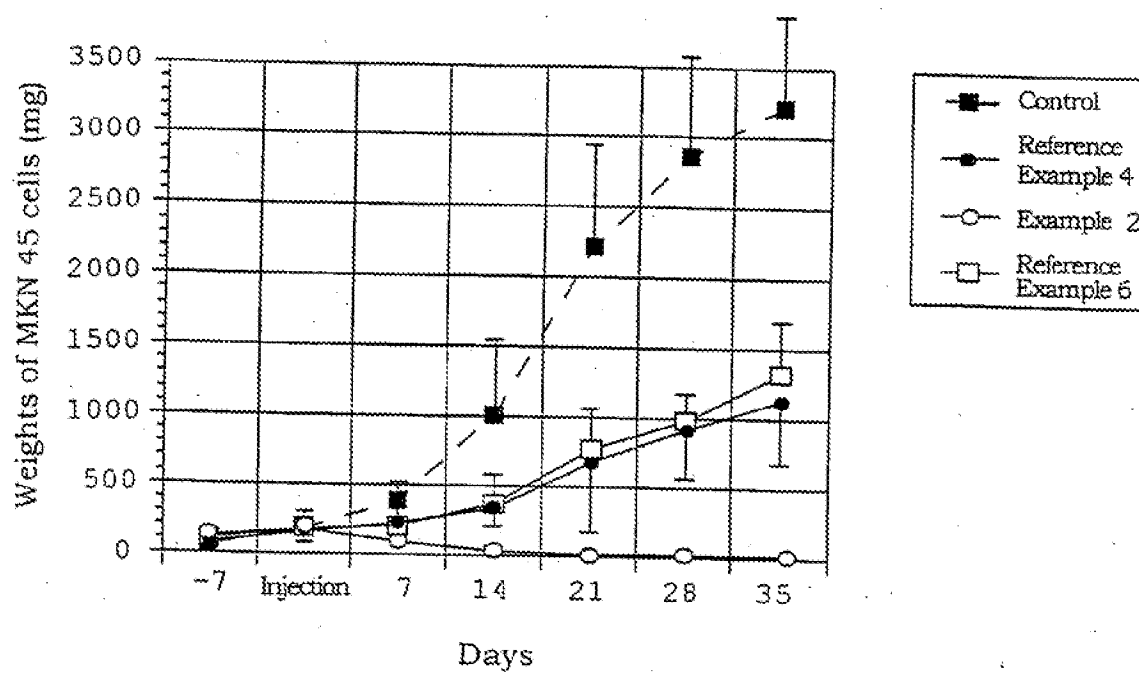


Fig. 15

Fig. 15

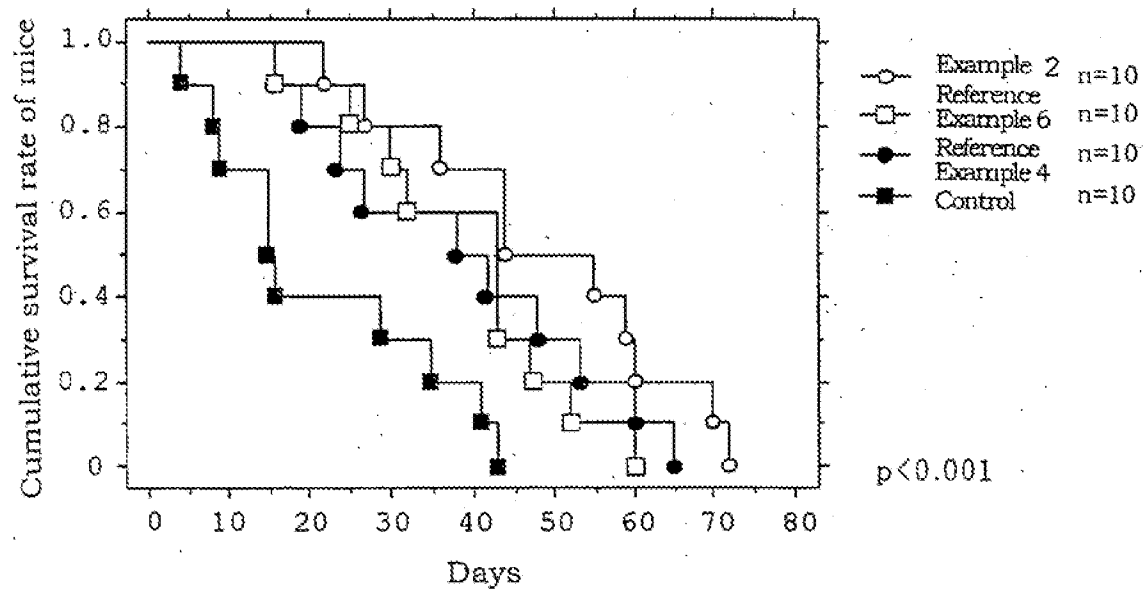


Fig. 16

Fig. 16

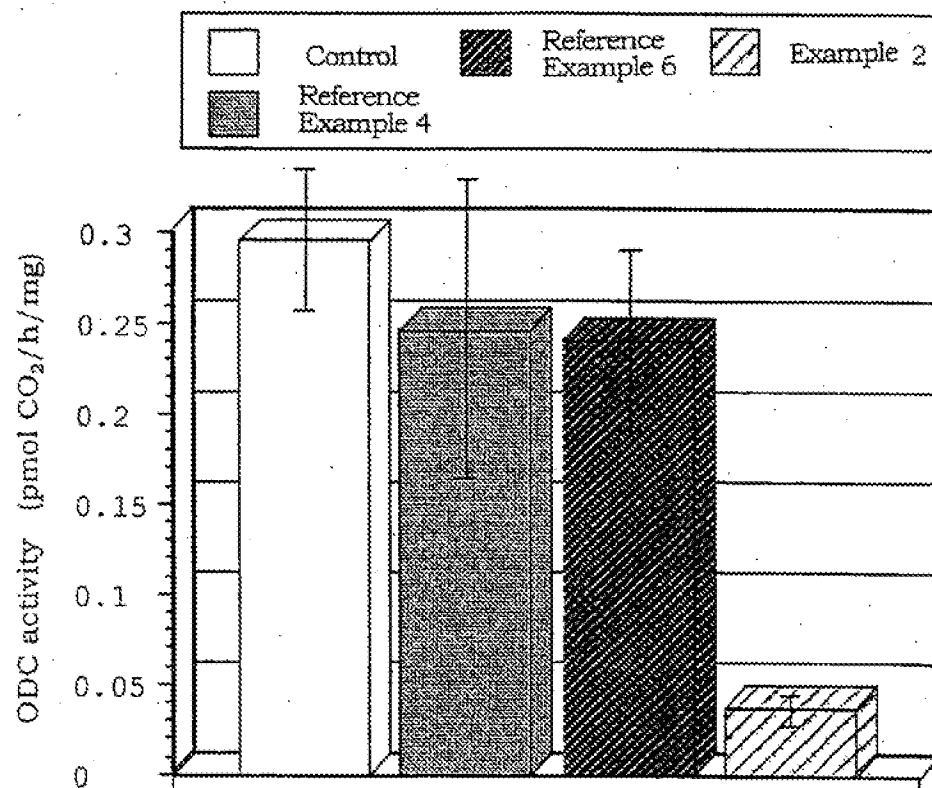


Fig. 17

Fig. 17

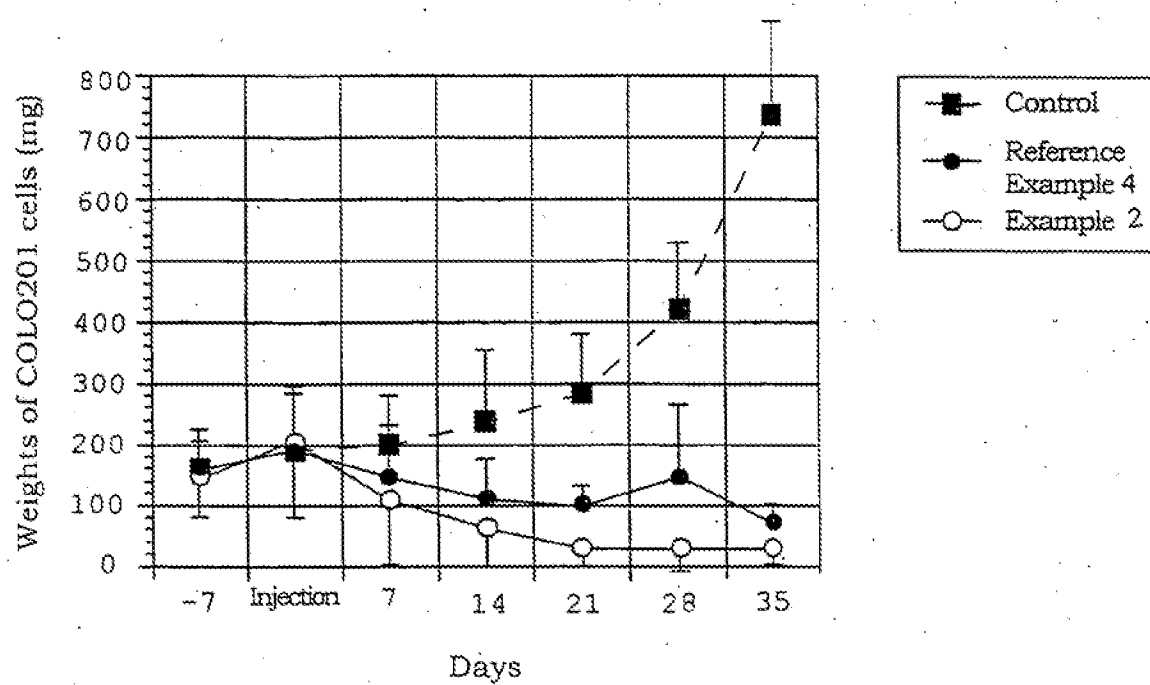


Fig. 18

Fig. 18

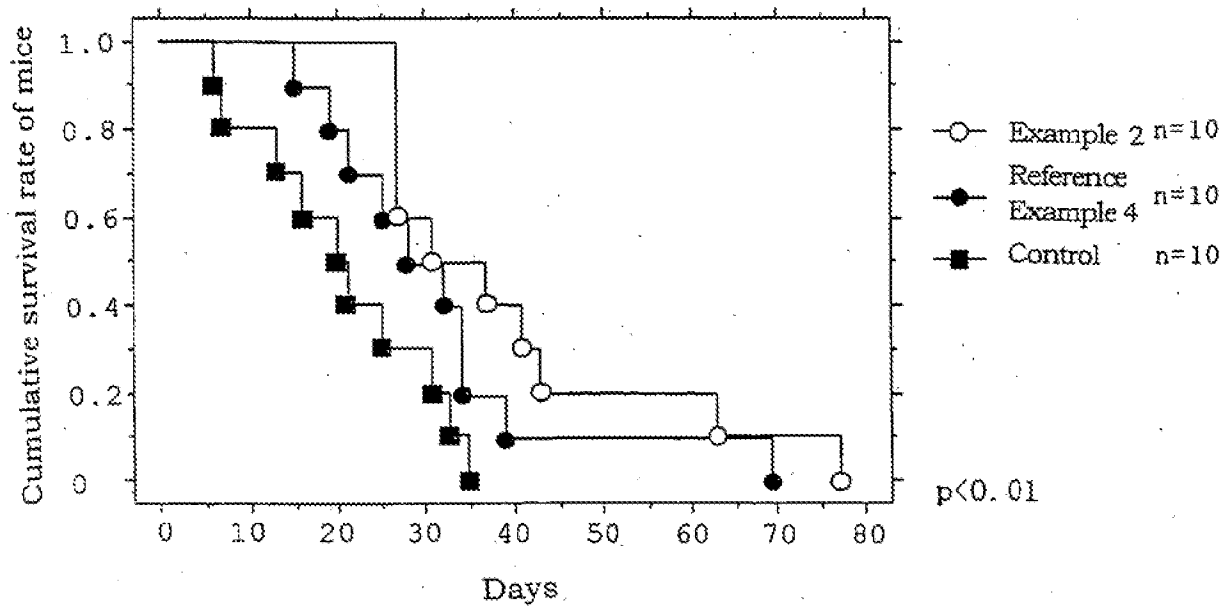
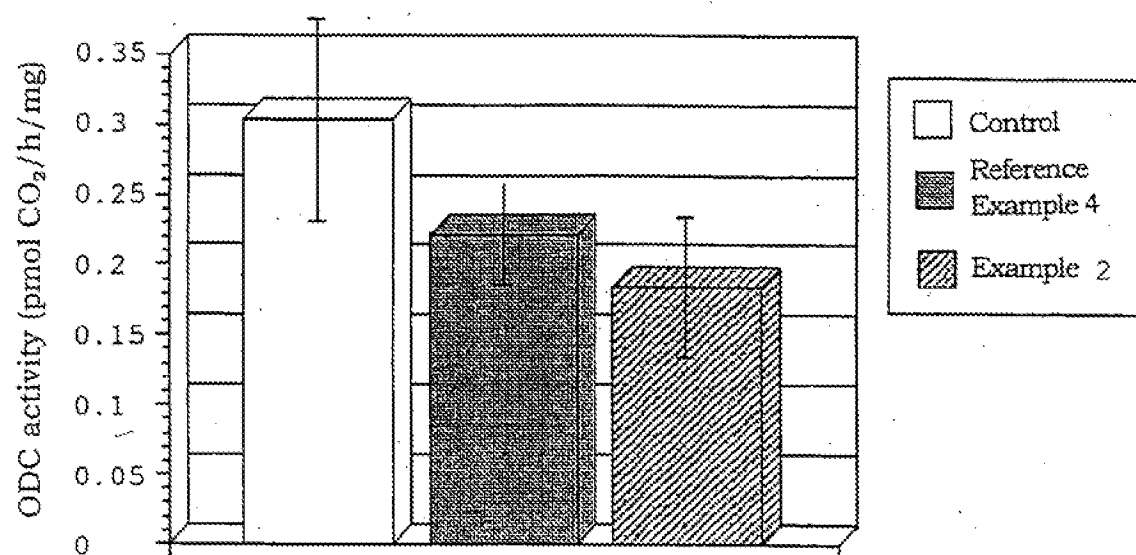




Fig. 19

Fig. 19



Document name: Abstract

Summary:

Object: To provide a preparation for transferring efficiently an oligonucleotide necessary in antisense therapy into cells, thus contributing to the treatment of various diseases.

Solution: A preparation for transferring a desired oligonucleotide into an animal cell, which comprises a collagen as an essential component, achieves the above object.

Selected figure: None

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.